

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. H. Rüsse
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. K. Walser

Galt - Diagnostik
mit Streptococcus B Latex-Agglutinations-Tests
und mit dem CAMP-Test

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Klaus Banzhaf
aus
Heidenheim

München 1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. M. Rüsse
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. K. Walser

Galt - Diagnostik
mit Streptococcus B Latex-Agglutinations-Tests
und mit dem CAMP-Test

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Klaus Banzhaf
aus
Heidenheim

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. K. Walser

Korreferent: Prof. Dr. B. Gedek

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Einleitung	1
1. Literatur	
Diagnostik der Streptokokken der serologischen Gruppe B	2
1.1. Anzüchtung	2
1.2. Selektivnährböden	2
1.3. Toxin-Kongorot-Blutagarplatte nach BECHT	7
1.4. Hämolyseverhalten der Streptokokken	8
1.5. HOTIS-Test	10
1.6. RK-Test	11
1.7. API-STREP Teststreifen	12
1.8. Pigmentbildung	12
1.9. Äskulin-Spaltung	14
1.10. Hippurat-Test	15
1.11. CAMP-Test	18
1.12. Serologische Differenzierung	29
1.12.1. Antigenextraktion	30
1.12.2. Röhrchenpräzipitation	34
1.12.3. Agargel-Präzipitation	34
1.12.4. Gegenstromelektrophorese	36
1.12.5. Fluoreszenzserologischer Nachweis	40
1.12.6. Enzyme-linked immunosorbent assay	43
1.12.7. Coagglutination	44
1.12.8. Latex-Agglutination	50

	Seite
2. Eigene Untersuchungen	57
2.1. Material	57
2.2. Methoden	62
2.2.1. Hämolyseverhalten	62
2.2.2. CAMP-Test	63
2.2.3. Äskulin-Spaltung	63
2.2.4. Hippurat-Spaltung	64
2.2.5. Pigmentbildung	64
2.2.6. Latex-Agglutinations-Tests	65
2.3. Ergebnisse	68
2.3.1. Hämolyseformen	68
2.3.2. Äskulin-Spaltung	68
2.3.3. CAMP-Test	69
2.3.4. Hippurat-Test	71
2.3.5. Pigmentbildung	71
2.3.6. Latex-Agglutinations-Test	72
3. Diskussion	74
4. Zusammenfassung/Summary	96
5. Literaturverzeichnis	98

Einleitung

Die Galtmastitis kommt in allen Ländern mit intensiver Milch-wirtschaft vor und stellt nach wie vor die wichtigste und ansteckendste Mastitis des Rindes dar.

In den letzten Jahren wird gehäuft über die Isolierung von *Streptococcus agalactiae* bei Erkrankungen des Menschen berichtet. Insbesondere als Erreger neonataler Meningitiden spielt *Sc. agalactiae* eine wichtige Rolle.

Die Frage der möglichen Übertragbarkeit von Gruppe B-Streptokokken vom Rind auf den Menschen scheint bisher nicht geklärt.

Grundvoraussetzung für eine planmäßige und erfolgreiche Mastitisprophylaxe und -therapie ist eine optimale bakteriologische Diagnose. Untersuchungsmethoden sind wünschenswert, die bei möglichst geringem Aufwand eine hohe diagnostische Sicherheit gewährleisten.

Es war das Ziel der vorliegenden Untersuchungen, festzustellen, ob Latex-Agglutinations-Tests für die Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B bei den Untersuchungen von Milchproben geeignet sind.

Im Vordergrund stand die Frage, welche diagnostische Sicherheit Agglutinations-Tests im Vergleich zum CAMP-Test gewährleisten können. Mit Rücksicht auf die Routinediagnostik sollte darüber hinaus der Schwierigkeitsgrad der Durchführung und Beurteilung sowie Arbeits- und Zeitaufwand der Methoden vergleichend beurteilt werden.

1. Literatur

Diagnostik der Streptokokken der serologischen Gruppe B

1.1. Anzüchtung

Im Rahmen bakteriologischer Milchuntersuchungen bildet die Anzüchtung der Keime auf Blutagarplatten die Grundlage für die Isolierung und Identifizierung. Dieser Nährboden bietet den anspruchsvollen Streptokokken optimale Wachstumsbedingungen und läßt die verschiedenen Formen der Hämolyse erkennen.

Um das Wachstum eventuell vorhandener Begleitkeime zu hemmen und die Streptokokken zu isolieren, können Selektivnährböden zur Anzüchtung verwendet werden.

1.2. Selektivnährböden

EDWARDS (1933, 1940) beschreibt eine Kristallviolett-Äskulin Blutagarplatte und eine Kristallviolett-Natriumazid-Bouillon zur selektiven Anzüchtung von Streptokokken aus Milchproben.

HAUGE und KÖHLER-ELLINGSEN (1953) ersetzen das Natriumazid durch Thalliumsulfat und fügten dem Medium Staphylokokken-Betatoxin in einer austitrierten Menge zu. Diesen Nährboden nannten sie nach seinen wichtigsten Bestandteilen Thalliumsulfat-Kristallviolett-Toxinblutagar

Kristallviolett hemmt das Wachstum von Staphylokokken und anderen grampositiven Keimen, während Thalliumsulfat die coliformen Bakterien unterdrückt.

Die zu untersuchende Milchprobe wurde zur Erzeugung von Tiefenkolonien mit dem noch flüssigen Nährboden gemischt. Nach 24 stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die TKT- Platten auf das Vorliegen von Kolonien, die mit geringer Aufhellung oder mit deutlicher Hämolyse gewachsen waren, untersucht. Solche wurden als galtverdächtig isoliert und auf CAMP- Reaktion sowie serologisch untersucht.

Infolge des CAMP- Phänomens (CHRISTIE, ATKINS und MUNCH-PETERSEN 1944) wächst *Streptococcus agalactiae* auf dem TKT-Agar unter Ausbildung einer breiten Hämolysezone. Einzelne Stämme von *Streptococcus uberis* ergeben eine ähnliche Hämolysezone. Andere Streptokokken als die zur serologischen Gruppe B gehörigen, die auf gewöhnlichem Blutagar mit einer Hämolysezone wachsen, zeigen auf dem TKT- Agar eine entsprechende Hämolyse (HAUGE und KÖHLER- ELLINGSEN 1953).

SANDVIK und HAUGE (1954) modifizierten die Rezeptur des TKT-Mediums und verbesserten dadurch die Unterscheidung CAMP-positiver von anderen Streptokokken. Das modifizierte TKT-Medium erwies sich nach ihren Angaben für den Nachweis von B-Streptokokken unter praktischen Verhältnissen als geeignet.

Nach HANSEN und WINTHER (1953) wurde das TKT- Medium bei Routineuntersuchungen mit gutem Erfolg eingesetzt und steigerte die Anzahl entdeckter infizierter Betriebe um etwa 50%.

Auch KÖHLER-ELLINGSEN und HAUGE (1953) empfehlen das TKT-Medium als gutes Hilfsmittel bei der Untersuchung der Anlieferungsmilch.

FODSTAD und BRATLIE (1954) strichen die Milchproben auf der Oberfläche des Nährbodens aus. Die Oberflächenkolonien der Streptokokken zeichneten sich durch eine jeweils charakteristische Farbtönung aus.

Nach 24-48 stündiger Bebrütung bei 37 °C sind die Streptokokken der Gruppe B als kräftige, stecknadelkopfgroße Kolonien mit glattem Rand und spiegelnder Oberfläche gewachsen. Die Kolonien haben eine zarte taubenblaue Farbe und sind von einer schwachen oder klaren, im Durchmesser verschieden breiten Hämolysezone umgeben, was sich nach dem Toxingehalt des Nährbodens richtet (SEELEMANN und OBIGER 1956).

Nach SEELEMANN und OBIGER (1956) ist die Anwendung des TKT-Mediums bei der Untersuchung von Kannenmilchproben zur Herauszüchtung von Galtstreptokokken und damit zur Ermittlung von infizierten Beständen von außerordentlicher Bedeutung. Diese Autoren halten es nicht für unbedingt notwendig, bei routinemäßigen Untersuchungen den CAMP- Test oder einen serologischen Nachweis anzuschließen, da es für einen eingearbeiteten Untersucher möglich sei, die Galtstreptokokken direkt zu ermitteln.

POSTLE (1968) konnte durch Einsatz des TKT- Mediums ohne Askulin bei Routineuntersuchungen annähernd doppelt so viele CAMP- positive Keime isolieren wie bei der Verwendung nicht selektiver Kulturmedien. 12,5% der CAMP- positiven Streptokokken erwiesen sich als *Streptococcus uberis*.

WARD u. Mitarb. (1970) konnten durch Zusatz von Askulin und Eisenzitrat zum TKT- Medium nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und nach weiteren 24 Stunden Aufbewahrung bei 22°C 93,8% der Agalactiae- und Uberis-Stämme richtig differenzieren.

SMITH und JOHNSTON (1972) bestätigten die Überlegenheit des sogenannten TKT/FC- Mediums nach WARD u. Mitarb. (1970) gegenüber dem TKT- Medium ohne Askulin- Zusatz bei der Differenzierung von *Streptococcus agalactiae* bzw. *uberis*.

Selektivnährböden auf der Basis des Thalliumsulfat-Kristallviolett- Mediums werden heute von der Industrie als feste oder flüssige Fertignährböden angeboten.

TOLLE (1966) und HEESCHEN u. Mitarb. (1968) berichten über die selektive Züchtung und Anreicherung euterpathogener Streptokokken in einem flüssigen Nährmedium (Streptosel Broth, Baltimore Biological Laboratories). Der Nährboden enthält als vergärbares Kohlenhydrat Glucose sowie Natriumazid und Kristallviolett zur Hemmung der störenden Begleitflora.



Um das Wachstum der Sarcinen, die sich bei massiver Infektion in der Streptosele-Bouillon häufig noch üppig entwickelten, zu unterdrücken, setzten sie dem Nährboden Kanamycin (HEESCHEN u. Mitarb. 1968) bzw. Kanamycin und Fucidin (TOLLE 1966) zu. Das Wachstum der Streptokokken wurde durch den Zusatz eines Indikators (Bromkresolpurpur) sichtbar. Bei der Spaltung der Glucose durch Milchstreptokokken wird Milchsäure gebildet und es kommt zu einer Absenkung des pH-Wertes, die der Indikator durch einen Farbumschlag anzeigt.

Das Nährmedium wurde mit 0,25ml Milch aus einer gründlich durchgemischten Probe beimpft. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C 22-24 Stunden lang. Die Untersuchungen ergaben, daß in Streptosele Broth annähernd die doppelte Anzahl von Galtstreptokokken und mehr als das Dreifache an sonstigen Mastitisstreptokokken im Vergleich zu der Anzüchtung auf Thalliumsulfat-Kristallviolett-Agar nachgewiesen werden konnte.

WALSER und HASENKNOPF (1968) verwendeten zur selektiven Anzüchtung und Anreicherung von Streptokokken aus 3048 Viertelgemelksproben Streptosele Broth (BBL) mit Zusatz von Bromkresolpurpur als Indikator und Kanamycin und Fucidin zur Hemmung des Wachstums der Sarcinen. Außerdem wurden die Proben nach der konventionellen Methode (Blutplatte und EDWARDS-Medium) untersucht.

Von den durch beide Methoden gesicherten insgesamt 417 Streptokokkenstämmen konnten mit der Plattenmethode 85,6%, mit Streptosele Broth 80,8% nachgewiesen werden. Sowohl mit

ein Teil der Stämme nicht erfaßt werden. Offensichtlich gelingt die Anzüchtung in einer Reihe von Fällen besser in der Bouillon, in anderen Fällen leichter auf der EDWARDS-Platte nach Bebrütung der Milch.

Die im Vergleich zu den vorhergehenden Autoren unterschiedlichen Ergebnisse sind vor allem damit zu erklären, daß bei diesen Untersuchungen vor der Anzüchtung auf EDWARDS- Agar die Milchproben 24 Stunden bei 37 °C bebrütet worden waren und damit ein Anreicherungsseffekt erreicht worden war.

Der Zusatz von Kanamycin und Fucidin erwies sich als gut geeignet zur Unterdrückung des Wachstums der Sarcinen.

1.3. Die Toxin-Kongorot-Blutagarplatte nach BECHT

BECHT (1961) suchte ein Medium, auf dem jeder Mastitiserreger kultiviert werden konnte und das es gleichzeitig ermöglichen sollte, eine Streptococcus agalactiae-Kolonie zu erkennen.

ITO (1940) hatte festgestellt, daß Trypanblau, Kongorot und andere Farbstoffe der Benzidinreihe das Streptolysin inaktivieren ohne das Wachstum der Bakterien zu hemmen.

Somit war durch den Zusatz von Kongorot zu einer Toxin-Kälberblutplatte die Möglichkeit gegeben, die Hämolyse der Streptokokken auszuschalten und so ein auftretendes CAMP-Phänomen schon bei der ersten Anzüchtung auf der Kongorot-Toxin-Blutagarplatte eindeutig zu erkennen. Das zusätzliche Anlegen einer CAMP-Platte erübrigte sich weitgehend (BECHT 1961).

Bei der Bechtschen Platte handelt es sich nicht um einen Selektivnährboden mit keimhemmenden Eigenschaften, sondern um eine spezifische Indikatorplatte für den Nachweis von Galtstreptokokken mit gleichzeitig günstigen Wachstumsbedingungen für die meisten Mastitiserreger. Anstatt das Bakterienwachstum zu hemmen, werden hier nur die Hämolyse der Streptokokken und Staphylokokken sowie einiger anderer Keime durch Kongorot unterdrückt, sodaß die auftretenden Hämolysezonen im allgemeinen nur auf das Zusammenwirken von Staphylokokken-Beta-Toxin und CAMP-Faktor zurückzuführen sind (KUHLMANN und MÜLLER 1964).

Einzelkolonien von *Streptococcus agalactiae* erscheinen nach 24 Stunden Bebrütung auf der Kongorot-Toxin-Blutagarplatte bei diffusem Licht als 0,5-0,75 mm grosse, etwas erhabene, glatte, runde, graurot glänzende, im Zentrum etwas stärker gefärbte Kolonien. Im durchfallenden Licht sehen sie kräftig rot bis braunrot aus und haben eine schwächer gefärbte Randzone (KUHLMANN und MÜLLER 1964).

Nach MEYER u. Mitarb. (1978) leistet die Kälberblutagarplatte mit Toxin-, Kongorot- und Äskulinzusatz in der Routinediagnostik der Galtstreptokokken hervorragende Dienste.

1.4. Hämolyseverhalten der Streptokokken

Nach SEELEMANN (1954) ist die Untersuchung des Hämolyseverhaltens wesentlich bei der Differenzierung der Streptokokken. Er unterscheidet alpha-, alpha'-, beta- und gamma-Hämolyse.

Bei der alpha-Hämolyse bildet sich unmittelbar um die Kolonie eine dichte Zone grau-grünlich verfärbter Erythrozyten. Es folgt eine deutlich aufgehellte Zone (der mit bloßem Auge sichtbar aufgehellte Ring), in der die Erythrozyten mehr oder weniger aufgelöst sind. Daran schließt sich zunächst eine schwach aufgehellte Übergangszone mit meist dünner eingesäten Blutkörperchen und schließlich folgt der unveränderte Blutagar.

Bei der alpha'-Hämolyse fehlt der Bereich grau-grünlich verfärbter Erythrozyten um die Kolonie, da die Blutkörperchen hier weitgehend aufgelöst sind.

Die beta-Hämolyse zeigt um die Kolonie eine besonders kräftige und breite Zone aufgelöster Erythrozyten. In der Regel folgt ein Bereich abgeschwächter Hämolyse und dann der unveränderte Nährboden.

Bei der gamma-Hämolyse kommt es i.d.R. zu keiner sichtbaren Veränderung des Blutagars, die Erythrozyten werden nicht angegriffen. Gelegentlich kann eine mehr oder weniger deutliche Aufhellung auftreten.

HAHN u. Mitarb. (1970) beurteilen die Hämolyse folgendermaßen:

Keine Veränderung, indifferentes Wachstum: gamma-Hämolyse

Totale Hämolyse: beta-Hämolyse

Partielle Hämolyse: Aufgehellte Zone um die Kolonie; die Betrachtung mit der Lupe läßt die teilweise gelösten Erythrozyten in Form einer gepunkteten Zone erkennen: alpha-Hämolyse.

Vergrünung: Grünschimmer über der alpha-Hämolyse. Besonders bei anaerober Bebrütung Bildung einer bräunlichen Verfärbung unter der Kolonie.

Die Hämolyseform darf nur bei Einzelkolonien beurteilt werden.

1.5. HOTIS - Test

Der von HOTIS und MILLER (1936) ausgearbeitete Test zur Diagnostik von Galtmastitiden wird folgendermaßen durchgeführt: In sterilen Röhrchen werden 0,5ml sterile 0,5%ige wässrige Bromkresolpurpurlösung mit 9,5ml der zu untersuchenden Milchprobe gemischt und dann 24 Stunden lang bei 37 °C bebrütet. Das Bromkresolpurpur ist bei einem pH-Wert von 5,2 gelb und bei einem pH-Wert von 7,0 purpur. Bei Vorliegen von *Streptococcus agalactiae* in der Milch wechselt die Farbe nach 24 Stunden Bebrütung von purpur nach gelb infolge des Säurebildungsvermögens des Erregers aus Laktose. Außerdem bilden sich kleine Flöckchen und Klümpchen in der Milch, die der Wand des Röhrchens anhaften. Sie bestehen aus Milchgerinnseln und Galtketten.

STABLEFORTH (1950) hält den Wert des HOTIS-Tests wegen der angeblich ungenügenden Spezifität für gering, da auch saprophytisch vorkommende Streptokokken und sonstige Bakterien Säurebildungsvermögen besitzen.

SCHALM und LEIDL (1960) beschrieben einen Schlüssel zur Beurteilung der verschiedenen HOTIS-Testreaktionen.

Sie untersuchten 3366 Viertelgemelksproben aus 26 Herden mit dem HOTIS-Test und verglichen die Ergebnisse mit denen der kulturellen Untersuchung auf Blut-Tryptose-Agar.

Der HOTIS-Test zeigte 89% der auf Blut-Tryptose-Agar festgestellten, mit *Streptococcus agalactiae* infizierten Viertel an. Teilweise wurden auch positive HOTIS-Testreaktionen durch andere Streptokokkenarten oder durch unspezifische Keime hervorgerufen.

SCHALM und LEIDL halten den HOTIS-Test für eine einfache und brauchbare Methode zur raschen Feststellung von *Streptococcus agalactiae*-Infektionen in einer Herde.

1.6. RK - Test

SKORKOVSKY (1973, 1974) verwendete in der Humanmedizin die unterschiedliche Empfindlichkeit der verschiedenen serologischen Gruppen der Streptokokken gegenüber Kaliumrhodanid als Differenzierungsmerkmal.

Er konnte auf diese Weise die Streptokokken der Gruppe B von den übrigen Gruppen, die in der humanmedizinischen Diagnostik bedeutsam sind, unterscheiden.

1.7. API-STREP Teststreifen (Fa. bio-Merieux)

MÄRKLEIN (1979) teilte erste Ergebnisse der Streptokokken-Differenzierung mittels API-STREP Teststreifen mit. Dieses Verfahren soll die Diagnose von Streptokokken der Gruppe A, B, C, D, G, H und K auf Grund des Hämolysetyps und zehn biochemischer Reaktionen ermöglichen.

Stämme der Gruppe A und B wurden mit serologischen Methoden und API-STREP völlig übereinstimmend differenziert. Die größten Abweichungen ergaben sich bei Angehörigen der Gruppe C, bedingt durch das spärliche Wachstum in der Bouillonkultur.

Es sind zwei Tage notwendig, um mit dem API-STREP die Gruppendiagnose stellen zu können.

1.8. Pigmentbildung

Hämolisierende Streptokokken der serologischen Gruppe B besitzen unter bestimmten Bedingungen (Nährbodenzusammensetzung, pH-Wert) die Fähigkeit, ein gelbes bis rotes Pigment zu produzieren.

Dieses Phänomen wurde zuerst von ORLA JENSEN (1919) und von DURAND und GIRAUD (1923) in Casein- Pepton- Agar nach Zugabe von Stärke im anaeroben Milieu beschrieben.

FALLON (1974) stellte fest, daß hämolysierende Streptokokken der Gruppe B auf Columbia-Agar (OXOID) unter Wasserstoff- und Kohlendioxidatmosphäre die deutlichste Pigmentbildung zeigten. Bei diesen Untersuchungen bildeten 85,7%

"Falsch-positive" Ergebnisse traten nicht auf, d.h. nur B-Streptokokken waren Pigmentbildner. Nicht hämolysierende Streptokokken bildeten kein Pigment.

JOKIPII und JOKIPII (1976) untersuchten bei beta-hämolysierenden B-Streptokokken aus klinischen Proben das Pigmentbildungsvermögen. Sie überimpften die Stämme auf Columbia-Agar-Platten (Fa.OXOID), die über Nacht bei 35 °C im anaeroben Milieu inkubiert wurden.

Von den 295 untersuchten B-Streptokokkenstämmen produzierten 97,3% unter diesen Bedingungen Pigment.

MERRITT u. Mitarb. (1976) wiesen die Pigmentbildung durch Streptokokken der Gruppe B in Stichagarkulturen im anaeroben Milieu nach. Die Stichkulturen wurden in Columbia- Agar ohne besondere Zusätze angelegt und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Dies bedeutet eine wesentliche Vereinfachung der Testdurchführung.

Drei Prozent der B-Streptokokken zeigten keine Pigmentbildung. Andere als Streptokokken der Gruppe B bildeten kein Pigment. Bemerkenswert ist ferner, daß vier der 66 pigmentbildenden Stämme nicht beta-hämolysierend waren.

MERRITT und JACOBS (1976) beschrieben ein Medium, welches das Erkennen nur schwacher Pigmentbildung erleichtert. Dieser von den Autoren als DMS-Medium bezeichnete Nährboden setzt sich zusammen aus GC basal medium (DIFCO) und 1% Proteose Pepton (Nr. 3 DIFCO). Der Nährboden ist weiß und ähnelt in seiner Zusammensetzung dem Columbia- Agar.

Von 90 getesteten B-Streptokokkenstämmen wurden auf Columbia-Agar sechs Stämme negativ in Bezug auf Pigmentbildungsvermögen beurteilt. Diese sechs Stämme waren auf dem DMS-Medium positiv. Von 158 serologisch bestätigten B-Streptokokken waren 156 auf DMS-Medium positiv. Falsch-positive Ergebnisse kamen nicht vor.

RICHTER-MEERWALD (1980) untersuchte die Pigmentbildung bei Mastitisstreptokokken von Rindern.

Bei 84% der B-Streptokokken aus Viertelgemelksproben war Pigmentbildung nachzuweisen. Bei den alpha'-hämolysierenden Stämmen machte der Anteil der pigmentbildenden fast 95% aus. Nur ein gamma-hämolysierender Stamm bildete Pigment. Nicht-B-Streptokokken waren in keinem Fall positiv.

1.9. Äskulin - Spaltung

DIERNHOFER (1932) beschrieb einen Differentialnährboden für Streptokokken, der 0,1% Äskulin enthielt. Euter- und Milchstreptokokken zeigen in diesem blau fluoreszierenden Nährboden die gleiche Wuchsform und die gleichen übrigen morphologischen Eigenschaften wie in gewöhnlicher Bouillon. Die Fähigkeit der eingepfzten Keime, das zugesetzte Äskulin spalten zu können, läßt sich am Verschwinden der Fluoreszenz und noch deutlicher an der bei nachträglichem Zusatz von Ferricitrat augenblicklich entstehenden Schwärzung der Flüssigkeit erkennen (DIERNHOFER 1932).

Äskulin ist ein Glykosid aus Roßkastanien, das von bestimmten Streptokokken in d-Glucose und Äskuletin gespalten wird. Das im positiven Fall entstehende Äskuletin reduziert das zugegebene Eisensalz und es bildet sich sofort ein grün-schwarzer Niederschlag (SEELEMANN 1954).

Äskulinspaltend sind v.a. die Streptokokken der serologischen Gruppe D sowie *Streptococcus uberis*.

Sc.agalactiae und *Sc.dysgalactiae* spalten Äskulin nicht, wobei jedoch bei *Sc.dysgalactiae* Ausnahmen vorkommen können (HEESCHEN und MEYER 1963).

Durch Zugabe von Äskulin bei der Herstellung von Agarplatten kann die Äskulinspaltung auch auf festen Nährböden beurteilt werden.

1.10. Hippurat - Test

Die Fähigkeit bestimmter Streptokokken, Natriumhippurat in Benzoesäure und Glyzin zu spalten, beschrieben schon AYERS und RUPP (1922).

Diese Eigenschaft besitzen in hohem Maße die Galtstreptokokken.

Die Hippuratspaltung kann sowohl durch den Nachweis der entstehenden Benzoesäure als auch durch den Nachweis des Glyzins bestätigt werden.

Der Benzoesäurenachweis erfolgt durch Zugabe von 7%iger bzw. 12%iger Eisenchloridlösung (AYERS und RUPP 1922; SEELEMANN 1954) oder 77%iger Eisenchloridlösung mit 0,2-0,25% konzentrierter Salzsäure (KLIMMER und SCHÖNBERG 1951).

Es entsteht Eisenbenzoat, das einen bräunlichen, unlöslichen Niederschlag bildet, wenn ein Fünftel oder mehr des Natriumhippurats gespalten worden ist (AYERS und RUPP 1922).

Im negativen Fall kann ein sedimentierender orangefarbener Niederschlag und ein klarer Überstand entstehen. Dieser Niederschlag kann jedoch wieder völlig gelöst werden (FERRIERI u. Mitarb. 1973).

Für den Nachweis der Benzoesäure ist eine zwei- bis dreitägige Inkubation der Streptokokkenkultur bei 37°C notwendig (SEELEMANN 1954; KLIMMER und SCHÖNBERG 1951).

Der Nachweis des Glyzins erfolgt mit Ninhydrin. Die Hippuratspaltung ist nachgewiesen, wenn bei der Zugabe der Ninhydrinlösung eine tief purpurne Färbung entsteht.

Streptokokkenstämme, die Hippurat nicht hydrolysieren, zeigen entweder keine Farbreaktion oder gelegentlich einen feinen purpurnen Farbton (HWANG und EDERER 1975).

Der Glyzinnachweis nach HWANG und EDERER (1975) kann bereits nach zwei Stunden Bebrütung bei 37°C durchgeführt werden. Man benötigt jedoch wesentlich mehr Ausgangsmaterial als beim Benzoesäurenachweis.

Diesen Schnelltest nach HWANG und EDERER variierte KUNTER (1985). Er inkubierte die zu prüfenden Streptokokkenstämme 16-18 Stunden bei 37°C, da der eindeutige Ausfall des Tests ganz wesentlich von der Menge des Kulturmateri als abhängt. Der Natriumhippurat-Schnelltest hat sich nach KUNTER (1985) als ein weitgehend zuverlässiges und relativ einfaches biochemisches Verfahren zur Identifizierung von B-Streptokokken erwiesen.

EDBERG und SAMUELS (1976) entwickelten einen colorimetrischen Schnelltest zur Bestimmung der Hydrolyse von Hippurat. Die Bestimmung erfolgt durch Zugabe zweier Reagentien: Rhodamin B bildet zusammen mit Benzoesäure eine Verbindung, die unter UV-Licht fluoresziert. Der Zusatz von Uranacetat macht diese Verbindung in normalem Licht sichtbar. Der Nachweis kann sowohl nach Kurzinkubation (3-4 Stunden) als auch nach längerer Inkubation (über Nacht) durchgeführt werden.

Alle geprüften 125 B-Streptokokkenstämme reagierten in diesem Test positiv.

Außer den Streptokokken der Gruppe B können auch Streptokokken der Gruppen C,D,E,N,P und U Natriumhippurat hydrolysieren (HEESCHEN und MEYER 1965; FACKLAM u. Mitarb. 1974; KUNTER 1985).

1.11. CAMP - Test

Der CAMP- Test beruht auf einem Phänomen, das von CHRISTIE, ATKINS und MUNCH- PETERSEN (1944) das erste Mal beschrieben und nach den Anfangsbuchstaben ihrer Nachnamen von MURPHY u. Mitarb.(1952) "CAMP-Phänomen" genannt wurde:

Streptokokken der serologischen Gruppe B verursachen eine deutliche vollständige Hämolyse von Schaf- oder Rindererythrozyten, wenn diese zuvor der Einwirkung von Staphylokokken-Betatoxin ausgesetzt waren.

Streptococcus agalactiae bildet den sogenannten CAMP-Faktor, ein thermostabiles, diffundierbares, extrazelluläres Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 23500 und einem isoelektrischen pH von ungefähr 8,3 (BERNHEIMER u. Mitarb. 1979) bzw. einem Molekulargewicht von 25 kD und einem isoelektrischen Punkt bei 8,9 (JÜRGENS u. Mitarb. 1985). Dieser Faktor führt zur vollständigen Auflösung der Erythrozytenmembran, wenn zuvor das Sphingomyelin der Membran durch das Betahämolysin der Staphylokokken, eine Sphingomyelinase, zu Ceramid abgebaut wurde (BROWN u. Mitarb. 1974).

Nach MARCHLEWICZ und DUNCAN (1980) besteht kein Zusammenhang zwischen CAMP-Faktor und dem Hämolysin der Streptokokken.

Da der CAMP-Faktor in erster Linie von B-Streptokokken produziert wird, kann der CAMP-Test in der Diagnostik zur Identifizierung von Galtstreptokokken eingesetzt werden:

Auf einer Schaf- oder Rinderblutplatte wird geradlinig durch den Mittelpunkt ein Betahämolytin bildender Staphylococcus aureus-Stamm ausgestrichen. Rechtwinkelig zum Staph. aureus werden die zu untersuchenden Streptokokken so ausgestrichen, daß die Impfstriche sich gerade nicht berühren (MUNCH-PETERSEN u. Mitarb. 1945).

Bei Vorliegen von B-Streptokokken bildet sich nach 20-24-30 Stunden langer Bebrütung bei 37°C im typischen Fall an der Stelle, wo Staphylokokken- und Streptokokkenimpfstrich sich fast berühren, in der Betahämolytinzone eine schalen- oder keilförmige vollständige Hämolyse aus, wobei die konvexe Seite dem Impfstrich des Staphylococcus zugewandt ist und die gerade Grundlinie von diesem abgewandt ist. Die Ränder der Hämolysezone sind scharf gezeichnet.

Nach MEYN und GEDEK (1962) sind Rinderblutplatten zur Durchführung des CAMP-Tests besser geeignet als Hammelblutplatten. Auch STÖPLER und HARR (1977) erwähnen, daß auf Schafblutagar schwache und vereinzelt auch typische CAMP-Reaktionen erheblich schlechter erfaßt werden als auf Rinderblutagar.

MUNCH-PETERSEN und CHRISTIE (1947) benutzten ein anderes Verfahren, um B-Streptokokken unter Ausnutzung der synergistischen Wirkung von CAMP-Faktor und Staphylokokken-Betahämolytin zu identifizieren: Galtverdächtige Kolonien, die auf Schaf- oder Rinderblutplatten gewachsen waren, wurden mit

Staphylokokken-Betatoxin betropft und danach bei 37 °C inkubiert. Zwei Stunden lang wurden die Platten alle 30 Minuten auf Veränderungen untersucht. Als Beweis für das Vorliegen von Streptokokken der Gruppe B wurde eine innerhalb von zwei Stunden auftretende vollständige Hämolyse um die fraglichen Kolonien gewertet.

Beim SUN-CAMP-Test nach HOVMAND (1952) wurden 1-2 Tropfen der Anlieferungsmilch (Kannenmilchprobe) auf einer Blutagarplatte ausgespatelt, wobei die Mitte der Platte frei blieb. Dann wurde ein Betatoxin bildender Staph. aureus- Stamm mit einem Stempel aus rostfreiem Stahl, dessen Form man mit einer strahlenden Sonne vergleichen kann, von einer Agarplatte, auf der er rasenförmig gewachsen war, aufgenommen und auf die Blutagarplatte beimpft.

Nach 12-14 Stunden Inkubation war das Betatoxin in drei Viertel der Plattenfläche diffundiert. Jene Kolonien, die in der Betahämolysinzone eine vollständige Hämolyse aufwiesen, wurden dann weiter untersucht.

KRETZSCHMAR (1959) entwickelte ein Verfahren, das die Anzüchtung von Mastitisserregern und die Identifizierung von Galtstreptokokken unter Ausnutzung des CAMP-Phänomens auf einer Blutagarplatte ermöglichte:

Auf einer Schafblutplatte wurden Verdünnungsausstriche des zu untersuchenden Milchsediments in verschiedenen Abständen zum

Impfstrich des Betahämolysin bildenden Staph. aureus angelegt. Auf diese Weise war es möglich, das Hämolyseverhalten der Bakterien sowohl im Bereich des Betahämolysins als auch außerhalb dieser Zone vergleichend zu beurteilen und echte Hämolyse von CAMP-Phänomen zu unterscheiden.

Dieser "direkte CAMP-Test" nach KRETZSCHMAR (1959) wurde von KUNTER (1967) modifiziert. In dieser Abwandlung wurden die Verdünnungsausstriche in einer anderen Form angelegt. Auf diese Weise war es möglich, zwei Milchproben, anstatt bisher nur einer, pro Platte zu untersuchen.

FUCHS u. Mitarb. (1978) beschrieben einen "Multiple Inocula (Replicator) CAMP-Test". Mit diesem Verfahren können auf einer Schafblutagarplatte 32 Proben gleichzeitig untersucht werden. Zwischen den 32 Streptokokken-Impfstellen wird ein Betahämolysin bildender Staph. aureus-Stamm ausgestrichen. Im positiven Fall bildet sich zwischen Sc. agalactiae-Kolonie und Staphylokokkenimpfstrich eine halbmondförmige Hämolysezone.

WILKINSON (1977) ersetzte bei ihren Untersuchungen in der Humanmedizin im sogenannten "CAMP-Disk-Test" den Staphylokokkenimpfstrich durch eine Papierscheibe, die mit Betahämolysin getränkt und danach getrocknet worden war. Diese Scheibe

wurde auf einer Schafblutagarplatte neben den Impfstrich des zu untersuchenden Streptokokkenstammes gelegt.

Im positiven Fall erscheint innerhalb von 24 Stunden bei einer Bebrütung bei 35°C in der dunklen Betahämolysinzone, die die Scheibe umgibt, eine sichelförmige klare Aufhellung.

PHILLIPS u. Mitarb. (1980) beschrieben einen Schnell-CAMP-Test zur Identifizierung von *Sc. agalactiae*. Dabei wurde eine Schaferythrozytensuspension zuerst der Einwirkung von Staphylokokken-Betatoxin ausgesetzt und nachfolgend der Überstand der zu testenden flüssigen Streptokokkenkultur zugegeben. Die Streptokokkenkultur war zuvor 4 Stunden lang bebrütet worden.

Von 130 B-Streptokokkenstämmen reagierten in diesem Test 96,2% CAMP-positiv, d.h. 10 Minuten nach Zugabe des Überstandes der Streptokokkenbouillon kam es zur Hämolyse der sensibilisierten Schaferythrozyten. Von 381 Nicht-Gruppe B-Streptokokken reagierte keiner positiv in dem Test.

Eine Beschleunigung der Ablesbarkeit des Platten-CAMP-Tests erreichten LÄMMLER u. Mitarb. (1984) durch den Zusatz von 0,04% Maltose oder Glucose zum Nährboden. Alle 55 von ihnen getesteten B-Streptokokkenstämme zeigten innerhalb von 8-10 Stunden Inkubation bei 37°C ein deutliches CAMP-Phänomen.

RATNER u. Mitarb. (1986) konnten das CAMP-Phänomen bei B-Streptokokken innerhalb von 18-24 Stunden nach Erhalt der Probe direkt auf der Blutagarplatte nachweisen. Sie brachten einen Tropfen "CAMP-Reagenz", das sie aus einer Staph. aureus-Bouillonkultur herstellten, in die Nähe der zu testenden Streptokokken-Kolonie. Nach 20-30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur bildete sich im positiven Fall an der Kolonie ein bogen- oder kreisförmiger Bereich verstärkter Hämolyse aus. Bei allen 207 Stämmen der Gruppe B stimmte das Ergebnis dieses Tests mit dem Ergebnis des Standard-CAMP-Tests überein.

Nach KRETZSCHMAR (1959) weisen Galtstreptokokken im Original-CAMP-Test nicht immer eine breite schalenförmige Hämolysezone auf. Bei 5-10% der Fälle erscheint die Hämolysezone keilförmig, etwa einem gleichseitigen Dreieck entsprechend.

THAL und OBIGER (1969) weisen darauf hin, daß nur eine genaue Beurteilung des CAMP-Tests bezüglich Form, Ausmaß und Limitzeichnung der vollständigen Hämolysezone eine Abtrennung des *Sc.agalactiae* von anderen Streptokokken- bzw. Bakterienarten erlaubt.

Die Fähigkeit, Erythrozyten, die unter der Einwirkung von Staph.-Betatoxin stehen oder standen, zu hämolysieren, besitzen auch Aernkokken, Mikrokokken und nicht hämolysierende Staphylokokken (Deltatoxinbildner). Auch bei

einigen coliformen Bakterien und bei Bazillen wurde eine Hämolyse in der Betatoxinzone beobachtet (THAL und OBIGER 1969).

Die meisten dieser Bakterien verursachen jedoch i.a. quadratische, zylindrische oder becherförmige hämolytische Felder ohne deutliche Abgrenzung am Übergang des Impfstriches zur Betatoxinzone. Diese untypisch geformten Hämolysefelder dürfen nicht mit dem echten CAMP-Phänomen verwechselt werden (THAL und OBIGER 1969).

Ebenso können auch Streptokokken, die nicht zur Gruppe B gehören, gelegentlich eine Auflösung der Erythrozyten im Bereich des Betatoxins bewirken, nämlich Angehörige der serologischen Gruppen A,C,D,E,G,K,L,N,O,P,Q und U (BEERWERTH 1963; BEERWERTH und KÖSER 1965a; HEESCHEN u. Mitarb. 1967; HELLMANN u. Mitarb. 1971; REMMERS 1973; SKORKOVSKY 1974; THAL und OBIGER 1969).

MÜLLER (1965) konnte bei der Untersuchung von 130 B-Streptokokkenstämmen quantitative Unterschiede bei der Bildung des CAMP-Faktors feststellen, ebenso ein CAMP-labiles Verhalten einer Reihe von Stämmen. Es gelang jedoch weder, die Produktion des CAMP-Faktors bei CAMP-negativen Galtstreptokokken zu induzieren, noch war es möglich, CAMP-positive Stämme durch Passagen in penicillinhaltiger Bouillon in ihrem CAMP-Verhalten zu beeinträchtigen.

BEERWERTH und KÖSER (1965) berichten, daß CAMP-positive Stämme der Gruppe D oft nach mehrmaliger Überimpfung ihre positive Reaktion verloren. Gegensätzliches Verhalten zeigten mehrere ursprünglich CAMP-negative B-Streptokokken.

Aus Galtbeständen, die wiederholt mit Penicillin-Präparaten behandelt worden waren, konnte KUNTER (1967) Stämme der Gruppe B isolieren, die im modifizierten direkten CAMP-Test schwach positiv bzw. in wenigen Fällen sogar negativ reagierten. Die von diesen B-Stämmen angelegten Subkulturen auf 5%igem Hammelblutagar unter Einbeziehung des CAMP-Phänomens führten ausnahmslos bereits nach der ersten oder zweiten Passage wieder zu deutlich ausgeprägten, typischen und auch bei den folgenden Passagen konstanten CAMP-Reaktionen.

Auch STÖPPLER und HARR (1977) äußern den Verdacht, daß *Sc.agalactiae*-Kulturen ohne das typische CAMP-Phänomen besonders als Folge einer antibiotischen Behandlung auftreten und empfehlen, Äskulin-negative Stämme ohne typische CAMP-Reaktion besonders aus vorbehandelten Beständen weiter zu untersuchen.

Bei strengem Ablesemodus, wobei ganz konsequent nur schalen- oder keilförmige Hämolysezonen in der Betatoxinzone des Staph. aureus als CAMP-positiv bewertet wurden, erhielten HELLMANN u. Mitarb. (1971) ein Ergebnis von nur 79,5% CAMP-positive B-Streptokokken.

Bei einem Teil der positiven Stämme zeigte das CAMP-Phänomen im Verlauf der mindestens dreimal wiederholten Prüfung nicht immer seine typische Form. 47 der 340 CAMP-positiven Stämme der Gruppe B (=11%) und 31 der 58 CAMP-positiven Stämme der übrigen serologischen Gruppen (=53%) konnten erst nach einer oder mehreren Kulturpassagen eindeutig als positiv erkannt werden oder mußten, was wesentlich seltener der Fall war, später als negativ beurteilt werden.

SKALKA u. Mitarb. (1980) stellten fest, daß zwar im Bereich des Betatoxins von Staphylococcus aureus sowohl Streptococcus agalactiae als auch Sc. uberis eine Hämolyseverstärkung bewirken, daß aber im Bereich einer hämolytisch aktiven "Exosubstanz" von Corynebacterium pseudotuberculosis, die sie "Corex" nannten, nur Sc. agalactiae eine vollständige Hämolyse hervorruft, während Sc. uberis dazu nicht fähig ist.

Die Angaben in der Literatur über den Anteil der Streptokokken der serologischen Gruppe B, die im CAMP-Test negativ reagieren, sind nicht ganz einheitlich (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: In der Literatur beschriebene Anteile CAMP-negativer Streptokokken der Serogruppe B

Autoren	Angegebene Größenordnung
BARNUM (1950)	1 Stamm (n= 40)
BEERWERTH u. KÖSER (1965)	3,2% (n=1520)
BEERWERTH u. Mitarb. (1965)	3 Stämme (n=108)
BIECHTELER (1964)	2 Stämme (n= 86)
DARLING (1975)	0 (n= 63)
FEY (1953)	1% (n=200)
FUCHS u. Mitarb. (1978)	0,3%(n=304)
GUTHOF (1961)	0 (n= 27)
HEESCHEN u. Mitarb. (1967)	2% (n=665)
HELLMANN u. Mitarb. (1971)	20,5%
HOFFMANN (1972)	3%
JOKIPII u. JOKIPII (1976)	5% (n=321)
KEXEL (1965)	0 (n= 81)
KRETZSCHMAR (1959)	1 Stamm (n= 93)
KUNTER (1967)	3,46%
KUNTER (1985)	11,2%(n=125)
LÜTTICKEN u. Mitarb. (1974)	7 Stämme (n=204)
MITSCHERLICH (1965)	0 (n=371)
MÜLLER (1965)	8,3%(n=218)
MUNCH-PETERSEN u. Mitarb. (1945)	0 (n=200)
MURPHY u. Mitarb. (1952)	3,4%

Tabelle 1 (Fortsetzung):

In der Literatur beschriebene Anteile CAMP-
negativer Streptokokken der Serogruppe B

Autoren	Angegebene Größenordnung
PULVERER (1967)	0 (n= 98)
REMMERS (1975)	3 Stämme (n=146)
SEELEMANN u. OBIGER (1956)	0 (n=277)
SKORKOVSKY (1974)	0,9%
STÖPPLER u. HARR (1977)	11,4%
VOIGT (1956)	4,9%

1.12. Serologische Differenzierung

Das biochemische Substrat für die serologische Gruppendifferenzierung nach LANCEFIELD (1933) ist das C-Polysaccharidantigen (C-Substanz) der Streptokokken. Dieses Antigen wurde bei allen serologisch eingruppierbaren Streptokokken der Gruppen A-U festgestellt. Außer bei den Gruppen D und N ist die C-Substanz in den inneren Schichten der Zellwand lokalisiert und eng mit dem Mucopeptid verflochten.

Die C-Substanz ist ein vielverzweigtes Polysaccharid, das meist aus Rhamnose, Glucose und Galactose besteht und auf den Seitenketten die spezifischen determinanten Gruppen, die die Grundlage für die serologische Differenzierung bilden, trägt. Die unterschiedliche serologische Spezifität beruht weniger auf einer qualitativ unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung der Polysaccharide als vielmehr auf Unterschieden in der Quantität der Bausteine und deren stereochemischer Struktur (HAHN u. Mitarb. 1970). Die serologische Spezifität der Gruppe B ist bestimmt durch ein Rhamnosereiches Polysaccharid (WITTNER und HAYASHI 1965).

Nach Extraktion kann die C-Substanz der Streptokokken durch verschiedene Methoden der Präzipitation bzw. Agglutination mit gruppenspezifischen Antiseren nachgewiesen werden. Die Gewinnung der Antiseren gelingt durch die Immunisierung von Kaninchen.

1.12.1. Antigenextraktion

Für die Gewinnung der Polysaccharidantigene sind verschiedene Extraktionsverfahren entwickelt worden.

LANCEFIELD (1933) extrahierte die gruppenspezifischen Antigene, indem sie das Sediment einer Bouillonkultur mit 0,05 normaler Salzsäure versetzte und 10 Minuten kochte. Nach dem Zentrifugieren wurde der wasserklare Überstand im Präzipitationstest eingesetzt.

Die Extrakte nach LANCEFIELD (1933) enthielten nicht-gruppenspezifische Substanzen, die im Präzipitationstest Kreuzreaktionen verursachen konnten, wenn die verwendeten Antiseren präzipitierende Antikörper enthielten, die nicht mit der C-Substanz reagierten (FULLER 1938).

FULLER (1938) beschrieb ein Extraktionsverfahren mit heißem Formamid. In dem heißen Formamid (150°C) lösen sich die Bakterien vollständig auf, während das C-Polysaccharid stabil bleibt.

Die FULLER-Extrakte führen zu deutlicheren Präzipitationsreaktionen als die LANCEFIELD-Extrakte (SEELEMANN 1954).

MAXTED (1948) entwickelte eine Extraktionsmethode, bei der die Streptokokkenzellwände der serologischen Gruppen A, B, C und G mit Hilfe eines Enzyms von *Streptomyces albus* lysiert werden.

Das Filtrat des Extrakts enthält die gruppenspezifischen Antigene und wird für die Präzipitationsreaktion verwendet.

WATSON u. Mitarb. (1975a) benutzten eine Kombination von *Streptomyces albus*-Filtrat und Lysozym, um das gruppenspezifische Polysaccharid der Gruppen A,B,C,D,F und G zu extrahieren.

Lysozym erwies sich als hervorragend geeignet zur Extraktion der gruppenspezifischen Antigene der serologischen Gruppe D. Mit *Streptomyces albus*-Filtrat konnten die Gruppen A,B,C,G und F extrahiert werden.

RANTZ und RANDALL (1955) extrahierten das C-Polysaccharid durch Autoklavieren. Das Sediment einer Streptokokkenkultur wurde 15 Minuten bei 120 °C und 1,3-1,4 atü autoklaviert. Durch anschließende Acetonausfällung können die Extrakte, die noch mit Proteinantigenen verunreinigt sind, weiter gereinigt werden.

Auch KUNTER (1965) beschreibt die Gewinnung der präzipitierenden gruppenspezifischen Polysaccharide durch Erhitzen der Streptokokken im Autoklaven. Das Sediment einer bebrüteten Nährbouillon wurde 60 Minuten bei 120 °C im Autoklaven erhitzt.

Alle 495 Streptokokkenstämme der Gruppen A-G ergaben mit den homologen Antiseren im Agargel-Diffusionstest auf dem Objektträger spezifische, kräftige und reproduzierbare Präzipitationslinien. Die Ergebnisse stimmten völlig mit denen nach FULLER-Extraktion überein.

Antigentitrationen der Extrakte von 15 Streptokokkenstämmen der Gruppe B mit hochwertigem B-Serum ergaben bei der Hitzeextraktion einen höheren Gehalt an gruppenspezifischen Antigenen als bei der FULLER-Extraktion. Dadurch waren bei einem großen Teil der Hitzeextrakte die Präzipitationslinien schneller und stärker ausgeprägt als bei den entsprechenden FULLER-Extrakten.

EDERER u. Mitarb. (1972) extrahierten das C-Polysaccharid betahämolisierender Streptokokken der serologischen Gruppen A-N mit Hilfe des Enzyms PRONASE B, einer im Handel erhältlichen Protease von *Streptomyces griseus*.

Bei der serologischen Gruppierung von 102 Streptokokkenstämmen erzielten die Autoren eine völlige Übereinstimmung mit der LANCEFIELD-Methode. Bei den Gruppen B, C und D waren die Präzipitationsreaktionen stärker als bei der Referenz-Methode.

Die PRONASE-Lösung kann im Kühlschrank oder eingefroren aufbewahrt werden. Zur Extraktion wird die PRONASE-Lösung dem Sediment einer 24 Stunden bei 37°C in Nährbouillon bebrüteten Streptokokkenkultur zugegeben. Die Extraktion erfolgt in 2-4 Stunden im Wasserbad bei 37-45°C. Nach dem Zentrifugieren kann der Überstand als Antigen für die weitere Untersuchung

REMMERS (1975) verglich die im Handel erhältlichen Extraktionsenzyme PRONASE B (Calbiochem) und PRONASE E (Merck) mit der Formamid-Extraktion nach FULLER (1938) in der Counter-Immuno-electrophorese nach EDWARDS und LARSON (1973). Es ergaben sich keine Unterschiede in der diagnostischen Sicherheit der enzymatischen Verfahren gegenüber der Methode nach FULLER (1938). Die Zahl der Arbeitsschritte verringert sich bei den enzymatischen Verfahren im Vergleich zur Formamid-Extraktion jedoch erheblich.

EL KHOLY u. Mitarb. (1974) extrahierten die gruppenspezifischen Antigene von betahämolisierenden Streptokokken, die 18 Std. auf einer halben Blutagarplatte gewachsen waren mit einem Tropfen Kochsalz, zwei Tropfen Natriumnitrit und einem Tropfen Eisessig. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (22°C) konnten geeignete Extrakte für die serologische Gruppendifferenzierung durch Kapillarpräzipitation erhalten werden. Die Resultate waren bei den Natriumnitrit-Extrakten und bei den Formamid-Extrakten gleich.

HRYNIEWICZ u. Mitarb. (1976) bestätigten die einfache Durchführbarkeit und Schnelligkeit der Extraktionsmethode nach EL KHOLY u. Mitarb. (1974). Die Empfindlichkeit wurde als zufriedenstellend beurteilt, auch wenn deutlich weniger Antigen extrahiert wurde als bei der LANCEFIELD-Standard-Methode.

1.12.2. Röhrrchenpräzipitation

Bei der Röhrrchenpräzipitation wird in 4 cm lange Röhrrchen mit einem Durchmesser von 3 mm Antiserum gefüllt und mit der gleichen Menge Antigenextrakt überschichtet. An der Berührungsstelle von homologem Antiserum und Extrakt entsteht eine Präzipitationsschicht, die nach etwa einer Minute sichtbar wird. Bei schwachen Seren kann sich der Eintritt der Reaktion verzögern. Zwischen heterologen Seren und Extrakten bleibt die Berührungsstelle klar.

Um Serum zu sparen, können Kapillarröhrrchen mit einem Durchmesser von 0,25-0,5 mm verwendet werden.

Nach SEELEMANN (1954) ist die Röhrrchenpräzipitation die Methode der Wahl, schnell und sehr gut ablesbar.

1.12.3. Agargel - Präzipitation

OUCHTERLONY (1949) beschrieb Untersuchungen, Antigen-Antikörperreaktionen in Agar sichtbar zu machen. Er führte seine Versuche in Petri-Schalen durch.

OTTO (1960) erzielte mit der Agargel-Präzipitation in Form des Plattentests bei der serologischen Differenzierung von Streptokokken zufriedenstellende Ergebnisse und empfahl dieses Verfahren für die Routinediagnostik.

MANSI (1958) modifizierte den Plattentest und führte die Agargel-Präzipitation auf dem Objektträger durch, was mit wesentlich geringerem Materialverbrauch bei schnellerem Reaktionsablauf möglich war.

KUNTER (1963) untersuchte die Möglichkeit, die Agargel-Präzipitation auf dem Objektträger bei der serologischen Differenzierung von Streptokokken einzusetzen.

Er verwendete FULLER-Extrakte und präzipitierende Seren nach SEELEMANN und OBIGER (1958) sowie Streptokokken-Trockenserum der BEHRING-Werke.

Die Ergebnisse der serologischen Gruppendifferenzierung mit Hilfe der Agargel-Präzipitation auf dem Objektträger stimmten mit denen der Röhrchenpräzipitation überein. KUNTER (1963) empfahl dieses Verfahren für den Routinebetrieb, da es zu konstanten, reproduzierbaren Ergebnissen führe und rationeller sei als die Röhrchen-Präzipitation.

HOFFMANN (1972) bestätigte die gute Verwendbarkeit der Agargel-Präzipitation bei Routineuntersuchungen. Um mehr Proben auftragen zu können, wurden die Objektträger durch größere Glasplatten ersetzt.

Nach MEYER, C. (1978) zeigte sich die Agargel-Präzipitation bei der Untersuchung von Sammelmilchen und von Viertelgemelksproben auf Vorliegen von *Sc. agalactiae* der Counter-immunelectrophorese deutlich unterlegen.

STÖPPLER und HARR (1977) untersuchten Viertelgemelksproben aus 1014 mastitisverdächtigen Milchkuhbeständen mit dem CAMP-Test und der Agargel-Präzipitation in kleinen Petrischalen. Ein Vergleich der beiden Methoden ergab, daß 19,5% der als galteinfiziert ermittelten Herden erst durch die serologische Untersuchung mit Hilfe der Agargel-Präzipitation ermittelt werden konnten.

1.12.4. Gegenstromelektrophorese

Die Gegenstromelektrophorese wird international als Counterimmunoelectrophoresis (CIE) bezeichnet.

Die Präzipitation von Antigenextrakten und homologen Antisera kann auch elektrophoretisch durchgeführt werden:

Es werden 3ml einer 1%igen Agaroselösung, bereitet in 0,05 M Veronalpuffer (pH 8,6), auf entfettete Objektträger geschichtet. In den erstarrten Agar werden drei Paare parallel verlaufender Lochreihen im Abstand von ca. 2 mm gestanzt. Die Lochreihe auf der Seite der Anode wird mit jeweils ca. 10µl Serum gegen die für die Diagnose von Mastitisserregern wichtigsten Streptokokkengruppen gefüllt. In die gegenüberliegenden Löcher auf der Kathodenseite pipettiert man die hergestellten Antigenextrakte. Nachdem mit Filterstreifen der Kontakt zur Pufferlösung hergestellt ist, wird mit 3 mA pro Objektträger die Elektrophorese durchgeführt. Die Präzipitationslinien

erscheinen zwischen den homologen Antigenen und Antiseren bereits nach ca. 20 Min. und sind nach etwa einer Stunde voll ausgeprägt (REMMERS 1975).

WADSTRÖM u. Mitarb. (1974) verglichen die Immundiffusion in Agargel mit der CIE bei der serologischen Gruppierung von Streptokokken der Gruppen A, B, C, D, G und H. Außerdem untersuchten sie, welche Art, das Polysaccharidantigen zu extrahieren, die geeignetste sei.

Die CIE erwies sich als schneller und wesentlich empfindlicher als die herkömmliche Agargeldiffusion. Bei beiden Methoden kam es teilweise zu Kreuzreaktionen.

Für die Antigenextraktion wurde die Methode mit Salzsäure nach LANCEFIELD (1933) bevorzugt.

HEDEN und ILLENI (1975) begründen die zehn- bis hundertfache Empfindlichkeit der CIE gegenüber dem konventionellen Agardiffusionstest damit, daß die Kräfte Endosmose und Stromfluß zu einer gegensätzlichen Wanderung von Antigen und Antikörper im elektrischen Feld führen. Sie werden so rascher aufeinander zubewegt und es kommt zu einer Konzentration der reagierenden Partner und zur schnellen Ausbildung der Präzipitationslinien.

DAJANI (1973) konnte nur 17 von 31 B- Streptokokkenstämmen nach Säureextraktion (LANCEFIELD 1933) mit der CIE nachweisen. Als Ursache für das schlechte Ergebnis nimmt er an, daß die verwendeten Antiseren zu schwach waren.

HILL u. Mitarb. (1975) konnten nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C in Nährbouillon alle 126 untersuchten B-Streptokokkenstämme ohne vorherige Antigenextraktion mit der CIE nachweisen.

Im Gegensatz dazu bringt nach Erfahrungen von ARVILOMMI u. Mitarb. (1978) die CIE ohne vorherige Antigenextraktion keine guten Ergebnisse.

EDWARDS und LARSON (1973) verglichen die CIE mit der Kapillarpräzipitationsmethode bei der serologischen Differenzierung von Streptokokken. Dabei waren die Ergebnisse beider Methoden übereinstimmend. Weiterhin ergab sich, daß die CIE 4-16 mal empfindlicher reagierte als die Kapillarpräzipitation, einfacher abzulesen und einfacher durchzuführen war. Bei dem Vergleich verschiedener Extraktionsverfahren stellte sich eine Kombination aus Autoklavierung und PRONASE B-Extraktion als am wirkungsvollsten heraus.

MERRITT u. Mitarb. (1976) empfehlen die CIE zur serologischen Differenzierung von Streptokokken, da sie weniger Antiserum benötigt und empfindlicher und leichter abzulesen ist als die Kapillarpräzipitationsmethode. Außerdem müssen nach ihren Angaben die Streptokokken der Gruppe B nicht säureextrahiert werden.

In einem Vergleich von CAMP-Test und CIE bei der Untersuchung galtverdächtigter Streptokokken aus Milchproben stellte REMMERS (1975) die höhere diagnostische Sicherheit der CIE bei der Bestimmung von B-Streptokokken fest. Er empfiehlt die CIE sowohl von den Kosten als auch vom Arbeitsablauf her für die Routinediagnostik von Galtstreptokokken.

RÖTTGER (1977) verglich die Leistungsfähigkeit des CAMP-Tests mit der der CIE bei dem Nachweis von B-Streptokokken aus Milchproben. Dabei wurde das Sediment von 10ml Milch über Nacht in Streptosel Broth (BBL) angereichert. Das Sediment der Anreicherungsbouillon wurde mit PRONASE E extrahiert.

Die CIE erwies sich als empfindlicher beim Nachweis von B-Streptokokken in der Milch latent infizierter Euter und in Herdensammelmilchproben.

Die homologen Antiseren bilden bei der CIE auch mit dem aus geschädigten und bereits abgestorbenen Streptokokken extrahierten Antigen deutliche Präzipitationslinien und die spezifische Präzipitation kommt unbeeinflusst von der bei Sammelmilch bisweilen vorhandenen Kontaminationsflora zustande (WIESNER 1979).

Als technischer Vorteil der CIE ergibt sich, daß die Untersuchungsergebnisse bereits am Tag nach dem Probeneingang vorliegen (RÖTTGER 1977).

SCHÜTZ u. Mitarb. (1984) verbesserten die CIE als serologischen Suchtest für Herdensammelmilchen. Durch Transport und Aufbewahrung nicht konservierter Proben, Anreicherung in hemmstofffreien Nährlösungen und geringfügige Veränderungen bei der Extraktion mit PRONASE E und der Elektrophorese wurde die Zahl der galtpositiven Proben verdreifacht.

In der Humanmedizin wird die CIE eingesetzt, um gruppen- und typenspezifische Streptokokkenantigene in Körperflüssigkeiten (Blut, Cerebrospinalflüssigkeit, Urin) nachzuweisen (STECHENBERG u. Mitarb. 1970).

1.12.5. Fluoreszenzserologischer Nachweis

Für die fluoreszenzserologische Untersuchung werden entweder Bouillonsedimente oder Kolonien von Rinderblutplatten auf entfetteten Objektträgern ausgestrichen. Dann werden die luftgetrockneten Präparate hitzefixiert. Mit einem Tropfen Konjugat der optimalen Verdünnung, gleichmäßig auf dem Präparat verteilt, erfolgt in 45 Minuten die Bindung bei 37°C in einer feuchten Kammer. Als Konjugat dienen mit Fluorescein-iso-thiozyanat markierte Antiseren. Ungebundenes Konjugat wird mit destilliertem Wasser vorsichtig abgespült. Das Präparat wird mit Glycerinphosphatpuffer bedeckt und ein Deckglas mit Paraffinumrandung angebracht. Die Auswertung erfolgt mit dem Fluoreszenzmikroskop im Auflicht und im Dunkelfeld (MÜLLER 1967).

SCHIMMELPFENNIG (1964) beschrieb Untersuchungen zum Nachweis und zur Differenzierung von *Streptococcus agalactiae* mittels fluoreszierender Antikörper. Bei der Untersuchung von 531 Milchproben mit einem kombinierten Anreicherungs-Fluoreszenzverfahren stimmten in 71% der fluoreszenzserologisch positiven und in 98,5% der fluoreszenzserologisch negativen Proben die Ergebnisse mit denen der kulturell-serologischen Kontrolluntersuchung überein. Der Anteil der Proben, in denen nur fluoreszenzserologisch, nicht aber kulturell-serologisch B-Streptokokken nachgewiesen werden konnten, betrug 29%.

MITSCHERLICH (1965) konnte mit dem fluoreszenzserologischen Verfahren von 222 galtnifzierten Proben nach Anreicherung in Streptosel Broth (BBL) 98,2% diagnostizieren. 13 Proben reagierten falsch positiv, was MITSCHERLICH in Anbetracht der hohen diagnostischen Sicherheit der fluoreszenzserologischen Untersuchung für tolerierbar hält.

MÜLLER (1967) konnte alle 591 von ihm getesteten B-Streptokokkenstämme fluoreszenzserologisch darstellen. Er beobachtete keinen Unterschied zwischen Ausstrichen von Bouillonkulturen, Blutplattenkulturen und Abklatschpräparaten ganzer Kolonien. Diese hundertprozentige Identifizierung war jedoch nur nach Anwendung mehrerer Konjugate möglich. Die einzelnen Konjugate färbten die B-Streptokokken zu 88-98% an. Teilweise auftretende Kreuzreaktionen verschiedener Konjugate mit Streptokokken der Gruppen A,C,E und L konnten durch Absorption beseitigt werden.

KARASEK (1970) erhielt bei 30 B-Streptokokkenstämmen eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse von Röhrchenpräzipitation und fluoreszenzserologischem Test. Er hält die fluoreszenzserologische Untersuchung zur Differenzierung aus der Milch isolierter Streptokokken für praktikabel.

ROMERO und WILKINSON (1974) erzielten bei ihrer Untersuchung zur Identifizierung von B-Streptokokken mittels Immunfluoreszenz bei 305 Stämmen eine hundertprozentige Übereinstimmung zwischen Präzipitationsnachweis und fluoreszenzserologischem Nachweis.

WATSON u. Mitarb. (1975b) weisen darauf hin, daß gute Konjugate und geschultes Personal Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz der Fluoreszenzserologie sind. Sie konnten 91% der B-Streptokokken richtig identifizieren. Bei den Gruppen D und F waren die Ergebnisse mit 53% bzw. 45% relativ schlecht.

ARVILOMMI u. Mitarb. (1978) konnten die Streptokokken der Gruppe B nicht differenzieren. Das verwendete B-Antiserum führte zu Kreuzreaktionen, sodaß kein Ergebnis abzulesen war.

1.12.6. Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA)

CUMMING u. Mitarb. (1980) führten bei 100 beta-hämolisierenden Streptokokkenstämmen der Gruppen A,B,C,D und G die serologische Differenzierung mittels ELISA durch. Sie erhielten mit dieser Methode die gleichen Ergebnisse wie mit einem Agargel-Diffusionstest.

Die Autoren halten ELISA für einfach, empfindlich und schnell durchführbar. Die etwas schwierige, anfängliche Standardisierung des Tests macht ELISA für Laboratorien, die nur wenige Proben pro Tag zu untersuchen haben, nach Meinung der Autoren wohl uninteressant.

LOGAN u. Mitarb. (1982) wiesen mit ELISA Antikörper gegen *Streptococcus agalactiae* in der Milch von Kühen nach, um auf diese Weise subklinische und latente Träger der Infektion zu erkennen. Als Antigen verwendeten sie ganze Bakterienzellen.

Die Autoren halten den Antikörpernachweis mit ELISA für ein wichtiges Hilfsmittel in einem Ausmerzungsprogramm für *Streptococcus agalactiae*, da es nur so möglich sei, latente und subklinische Träger von primär Infizierten zu unterscheiden.

1.12.7. Coagglutination

Bei der Coagglutination mit Protein A-haltigen Staphylokokken kommt es zu einer spezifischen Reaktion zwischen Streptokokken bestimmter serologischer Gruppen und Protein A-haltigen Staphylokokken, die für diese Reaktion besonders vorbehandelt wurden: Gewaschene Staphylokokken aus einer über Nacht bebrüteten Bouillon wurden drei Stunden lang mit 0,5%igem Formaldehyd behandelt, dann 4 Minuten lang auf 80°C gehalten und schnell abgekühlt. Diese Protein A-haltigen, Formaldehyd- und hitzebehandelten Staphylokokken werden dann mit spezifischem Antiserum vom Kaninchen gemischt.

Protein A von *Staphylococcus aureus* ist ein zellwandassoziiertes Eiweiß, das eine hohe Affinität zum Fc-Fragment des Immunglobulin G aufweist. Das Fab-Fragment des Immunglobulin G, das mit dem entsprechenden Antigen reagiert, orientiert sich bei der Bindung des Immunglobulins aus dem Antiserum an das Protein A des Staphylokokkus nach peripher.

Auf diese Weise behandelte Staphylokokken werden nur durch das korrespondierende homologe Antigen agglutiniert und können so zur serologischen Differenzierung von Streptokokken herangezogen werden.

Ein Tropfen der spezifischen Staphylokokkensuspension und ein Tropfen Trypsin-behandelte Streptokokkenkultur werden auf einem Objektträger gemischt. Im positiven Fall kommt es nach 30 Sekunden zu einer mit dem bloßen Auge sichtbaren Agglutination (CHRISTENSEN u. Mitarb. 1973).

CHRISTENSEN u. Mitarb. (1973) führten bei 179 Streptokokkenstämmen auf die beschriebene Weise die serologische Eingruppierung durch und verglichen das Ergebnis mit dem der Immunelektrophorese (WADSTRÖM u. Mitarb. 1974) nach LANCEFIELD-Extraktion (1933). Die Resultate stimmten völlig überein.

Eine Methode, das gruppenspezifische C-Polysaccharid beta-hämolysierender Streptokokken der Gruppen A,B,C und G mit Hilfe der Coagglutination durch spezifisch sensibilisierte Protein A-haltige Staphylokokken direkt auf der Blutagarplatte nachzuweisen, beschrieben EDWARDS und LARSON (1974). Bei diesem sogenannten "Spot-Test" wurde ein Tropfen Staphylokokken-Reagenz auf die zu testende Kolonie auf der Blutplatte aufgetropft. Im positiven Fall kam es gewöhnlich innerhalb von 1-3 Minuten zu einer Agglutination, die mit Hilfe eines Mikroskopes beobachtet werden konnte. Es fiel besonders auf, daß die Reaktion auch positiv ausfiel, wenn die Kolonie selbst vom Agar entfernt worden war. Dies deutet darauf hin, daß lösliches gruppenspezifisches Polysaccharid in einiger Menge in das umgebende Medium diffundiert war und mit den sensibilisierten Staphylokokken reagierte. Mit dieser Methode war es möglich, beta-hämolysierende Streptokokken 18 Stunden nach Anlegen der Kultur zu identifizieren (EDWARDS und LARSON 1974).

HAHN und NYBERG (1976) führten Untersuchungen zur serologischen Eingruppierung von Streptokokken der Gruppen A,B,C und G mit Hilfe der Coagglutination durch, wobei sie ein im Handel erhältliches Reagenz, das sensibilisierte Staphylokokken in lyophilisierter Form enthält (Phadebact Streptococcus Test der Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala), verwendeten. Die Reagentien wurden im wesentlichen nach der Methode von CHRISTENSEN u. Mitarb. (1973) hergestellt. Die Streptokokken wurden keiner Extraktion unterzogen. Von 150 Streptokokkenstämmen der Gruppen A,B,C und G, die über Nacht bebrütet worden waren, konnten nur zwei Stämme (1,3%) nicht richtig eingruppiert werden.

Ebenfalls mit dem Phadebact Streptococcus Test konnte ROSNER (1977) von 132 Streptokokkenproben 131 richtig differenzieren. 119 der 131 Stämme konnten schon nach 4 Stunden Inkubation in einer Nährbouillon, in die sie von der Platte übertragen worden waren, richtig eingruppiert werden. Das Ergebnis für die restlichen 12 Stämme stand nach 12 Stunden fest. ROSNER verwendete für die Coagglutination 6-7 Tropfen der Zellsuspension und erhielt oft Kreuzreaktionen bei den Gruppen A und C. Da jedoch die Kreuzreaktionen schwächer ausfielen als die spezifischen Agglutinationen, war die Ablesbarkeit nicht in Frage gestellt.

FINCH und PHILLIPS (1977) konnten alle untersuchten Streptokokken der Gruppen A,B,C und G, die über Nacht in 2,5ml Nährbouillon bebrütet worden waren, mit dem Coagglutinations-Testsatz trotz auftretender Kreuzreaktionen richtig gruppieren. Bei den Streptokokken der Gruppe B traten die Agglutinationen am schnellsten auf und waren am deutlichsten ausgeprägt.

MOSIMANN und BRUNNER (1979) konnten alle 305 von ihnen untersuchten beta-hämolysierenden Streptokokkenstämme der serologischen Gruppen A,B,C und G mit dem Phadebact Streptococcus Test korrekt gruppieren. Die Gruppenzugehörigkeit war für 68% vier Stunden, für 92% 24 Stunden nach Isolation von der Primärkultur ermittelt, wenn vier Kolonien als Inoculum für die Bouillon verwendet wurden. Die restlichen Stämme, die innerhalb dieses Zeitraumes nicht gruppierbar waren, gehörten alle der Gruppe C an. Um störende Mehrfachagglutinationen, die bei 12% der Stämme auftraten, zu vermeiden, erwies sich die Zentrifugation der Nährlösungen als der Trypsinierung überlegen und ergab eindeutig ablesbare, richtige Ergebnisse.

LELAND u. Mitarb. (1978) konnten das Auftreten von Kreuzreaktionen vermeiden, indem sie statt der Zellsuspensionen nur den Überstand für die Coagglutinationsreaktion verwendeten. Die Agglutinationen waren bei allen B-Streptokokken bereits nach sechs Stunden Inkubation positiv, wenn nur eine Kolonie von der Agarplatte in Nährlösung aufgeschwemmt worden war.

SLIFKIN u. Mitarb. (1978) untersuchten die Möglichkeit, beta-hämolysierende Streptokokken der Gruppen A,B,C und G mit dem Phadebact Streptococcus Test direkt von der Blutplatte bzw. nach vier und nach 24 Stunden Inkubation serologisch einzugruppieren. Für die direkte Coagglutination von der Blutplatte waren mindestens fünf Kolonien notwendig. 129 der 200 untersuchten Stämme zeigten genügend Wachstum, um der direkten Coagglutination unterzogen werden zu können. Davon konnten 127 entsprechend der LANCEFIELD-Methode (1933) richtig eingruppiert werden. Nach vier Stunden Inkubation konnten 192 und nach 24 Stunden Inkubation alle 200 Stämme richtig identifiziert werden. Eine Extraktion wurde nicht durchgeführt.

KIRKEGAARD und FIELD (1977) führten sowohl die serologische Gruppierung als auch die Typisierung der B-Streptokokken mit Hilfe der Coagglutination durch. Entsprechend wurden Protein A-haltige, hitze- und formaldehydbehandelte Staphylokokken sowohl mit gruppen- als auch mit typenspezifischen Antikörpern besetzt.

Die aus vier Kolonien durch Säureextraktion gewonnene Antigenmenge reichte aus, alle 141 B-Streptokokken richtig zu gruppieren. Die Extraktion und serologische Gruppierung dauerten etwa 30 Minuten. Falsch positive Ergebnisse traten nicht auf.

CARLSON und MC CARTHY (1979) verwendeten für die serologische Gruppierung von Streptokokken der Gruppen A,B,C,D,F und G mittels Coagglutination Antigenextrakte, die nach der Methode von WATSON u. Mitarb. (1975a) mit einem Gemisch von Streptomyces albus- Filtrat und Lysozym gewonnen worden waren. Alle 102 Stämme, die in Nährlösung gezüchtet worden waren, konnten mit dieser Methode gruppiert werden. Von 97 Stämmen, die auf Blutagar gewachsen waren, wurde Antigen aus fünf isolierten Kolonien extrahiert. Mit dieser Methode konnten 95,9% der Stämme richtig identifiziert werden.

Nur eine Kolonie benötigten SLIFKIN und INTERVAL (1980) für die serologische Eingruppierung beta-hämolisierender Streptokokken von Rachenabstrichen mit dem Phadebact Streptococcus Test nach Antigenextraktion mit salpetriger Säure.

Zweihundert ausschließlich bovine Mastitisstreptokokkenstämme der Gruppen B,C,E,G und L ordnete SAXEGAARD (1977) mit Hilfe der Coagglutination im Vergleich zur LANCEFIELD-Präzipitation (1933) serologisch ein.

Bei 95,5% der Stämme erhielt er übereinstimmende Ergebnisse. Sechs von 61 B-Streptokokkenstämmen konnten mit der Coagglutination nicht eingruppiert werden. Teilweise auftretende Kreuzreaktionen konnten anhand ihrer geringen Intensität im allgemeinen gut von Agglutinationen mit homologem Antigen unterschieden werden; mit der Ausnahme, daß gewisse L-Stämme mit Anti-B-Staphylokokkenreagenz intensiv kreuzreagierten.

In Anbetracht der relativ geringen diagnostischen Sicherheit bei der Identifizierung von B- Streptokokken wird neben der Coagglutination die Präzipitation als zusätzlicher Test empfohlen.

TIESLER und RECKTENWALD (1979) stellten vergleichende Untersuchungen zur serologischen Differenzierung von Streptokokken der Gruppen A,B,C und G mit den Methoden der Coagglutination und dem Immunfluoreszenztest an. Die Ergebnisse der Immunpräzipitation wurden als Bewertungsgrundlage herangezogen. Die Coagglutinationsteste zeigten Übereinstimmung mit der Immunpräzipitation in 94,5%, die Immunfluoreszenz in 93,5% der Fälle.

Fast 10% der untersuchten Stämme mußten 15 Sekunden mit 20mW Ultraschall behandelt werden, da ihr körniges Wachstum anfangs eine eindeutige Ablesung des Coagglutinationstests verhinderte.

1.12.8. Latex - Agglutination

Beim Latex-Agglutinations-Test wird, ähnlich dem Coagglutinationstest mit Protein A-haltigen Staphylokokken, eine Träger-substanz verwendet, an die die spezifischen Antikörper gebunden sind. Bei der Latex-Agglutination dienen als Träger Latex-Partikel. Zur Sensibilisierung der Latex- Partikel wird nicht wie bei der Coagglutination Serum, sondern nur

die Immunglobulin - Fraktion der Antiseren verwendet: Ein Raumteil der passenden Globulin-Verdünnung wird gemischt mit einem Raumteil einer Suspension, die $0,81 \mu\text{m}$ große Latex-Partikel enthält. Diese Mischung wird zwei Stunden lang im 37°C warmen Wasserbad inkubiert und dann 15 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment in glycerinepufferter Kochsalzlösung, die 0,1% Rinderalbumin und 0,1% Natriumazid enthält, aufgeschwemmt. Diese Suspension wird bei 4°C gelagert.

Von den zu testenden Stämmen werden einige Kolonien in 0,2ml einer 0,1% Trypsin enthaltenden glycerinepufferten Kochsalzlösung aufgeschwemmt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird ein Tropfen der Suspension mit einem Tropfen der sensibilisierten Latexpartikel auf einem Objektträger gemischt, eine Minute vorsichtig hin und her bewegt und gegen einen dunklen Hintergrund beurteilt (LUE u. Mitarb. 1978).

LUE u. Mitarb. (1978) verglichen bei der serologischen Differenzierung beta-hämolysierender Streptokokken die Latex-Agglutination mit der LANCEFIELD-Methode (1933). Von 101 B-Streptokokken konnten 97 mit der Latex-Agglutination richtig identifiziert werden.

WAITKINS u. Mitarb. (1979) führten bei 30 Streptokokkenstämmen, darunter acht B-Streptokokken, die serologische Differenzierung mit einem im Handel erhältlichen Latex-Agglutinationstest durch.

Bei einigen Stämmen führte erst eine Wiederholung des Tests zum richtigen Ergebnis. Vor allem die Streptokokken der Gruppe D reagierten nicht ausreichend mit den homologen Antiseren.

FAÇKLAM u. Mitarb. (1979) verwendeten ebenfalls im Handel erhältliche Latex-Agglutinations-Reagenzien zur serologischen Differenzierung von Streptokokken. Als Extraktionsmittel enthielt der Testsatz Pronase.

In 0,4ml Pronaselösung wurde Bakterienmaterial von einer Blutagarplatte, die über Nacht bebrütet worden war, zu einer dichten Suspension aufgeschwemmt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 56 °C erfolgte eine Zentrifugation. Der Überstand enthielt den Extrakt und wurde mit den Latex-Reagentien getestet. Ein Tropfen dieses Extraktes wurde mit je einem Tropfen der für die Gruppen A,B,C,D,F und G spezifischen Latex-Lösungen auf einer Glasplatte gemischt und auf entstehende Agglutinationsreaktionen untersucht.

Bei 97% der beta-hämolysierenden Stämme stimmten die Ergebnisse der Latex-Agglutination in Verbindung mit Pronase-Extraktion mit denen der LANCEFIELD-Methode (1933) überein. Wenn die Extrakte nach einer modifizierten Autoklavemethode gewonnen wurden, betrug die Übereinstimmung 99%. Bei der Identifizierung nicht beta-hämolysierender Stämme waren die Ergebnisse der Latex-Agglutination deutlich schlechter.

POUTREL (1983) stellte bei der Beurteilung der Einsetzbarkeit eines handelsüblichen Latex-Tests bei der serologischen Gruppierung von 144 Mastitisstreptokokken-Stämmen der Gruppen B,C und D eine 98%ige Übereinstimmung der Ergebnisse des Agglutinationstestes und der LANCEFIELD-Methode (1933) fest.

LÜTTICKEN (1981) führte bei 150 Streptokokken-Stämmen aus klinischem Untersuchungsmaterial die serologische Gruppierung mit Hilfe eines Latex-Agglutinations-Testes nach Anzüchtung der Keime auf Blutagarplatten durch.

Er stellte fest, daß die Extraktion mit salpetriger Säure nach EL KHOLY u. Mitarb. (1974) bei den Streptokokken-Gruppen A,B,C,F und G mehr Antigen freisetzte als die vom Hersteller empfohlene Enzymextraktion.

Nach Extraktion mit salpetriger Säure fielen die Agglutinationen deutlicher und schneller aus. Alle Stämme der Gruppen A,B,C,F und G ließen sich rasch und eindeutig identifizieren.

HAHN (1980) identifizierte 173 Streptokokken-Stämme der serologischen Gruppen A,B,C,D,F und G, isoliert aus human- und veterinärmedizinischem Untersuchungsmaterial, unter Verwendung eines Latex-Agglutinations-Testes mit Pronase als Extraktionsmittel.

Die Antigenzubereitung erfolgte sowohl aus suspendierten Kolonien von Blutagarplatten als auch aus Sedimenten flüssiger Kulturen.

Bei der Verwendung von Kolonien von der Agarplatte traten die Reaktionen in etwa der Hälfte der Fälle deutlich verzögert auf und konnten erst nach 2,5-10 Minuten abgelesen werden. Die Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen der Kapillarpräzipitation als Referenzmethode lag bei Verwendung von Kolonien bei 98,6% und betrug bei der Verwendung von Bouillonsedimenten 100%. Kreuzreaktionen traten nicht auf.

HAHN (1982) beschrieb einen vereinfachten Latex-Test zur Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppen A,B,C,D,F und G.

Bei diesem Test genügt eine 4-6 Stunden inkubierte Bouillon zur Antigenherstellung und sämtliche Zentrifugierarbeiten entfallen.

Es wurde festgestellt, daß dieser modifizierte Latex-Test im Hinblick auf Beschleunigung und Vereinfachung der Antigen-Präparation durch Verwendbarkeit auch mäßig gewachsener Kulturen und den völligen Wegfall der Zentrifugationsschritte eine bemerkenswerte Verbesserung darstellt. Er zeichnet sich ferner durch eine höhere Sensibilität und noch deutlicher ablesbare Agglutinationen aus.

DANIEL und BARNUM (1986) benutzten einen Latex-Agglutinations-Test, um Gruppe B-Antigene in der Milch *Streptococcus agalactiae*-infizierter Kühe nachzuweisen. Fünfzehn von 17 bekannten Infektionen konnten nachgewiesen werden. Bei neun der Proben war es notwendig, die Molke 18 Stunden bei 37°C zu inkubieren.

LÖGERING (1981) untersuchte 161 aus Einsendematerial isolierte beta- hämolysierende Streptokokken-Stämme und 7 Referenzstämme auf ihre serologische Gruppenzugehörigkeit mit den Methoden der Präzipitation, direkten Immunfluoreszenz, Coagglutination, Latex-Agglutination und biochemischen Differenzierung.

Die direkte Immunfluoreszenz lieferte bei 94% der Stämme ein mit der Präzipitation übereinstimmendes, in einigen Fällen jedoch unsicheres Ergebnis. Die Resultate der Coagglutination, mit der die Gruppen D und F nicht bestimmt werden können, und der Latex-Agglutination entsprachen bei 99% der Stämme denen der Präzipitation. Die biochemische Differenzierung mit dem Api- Strep gelang bei allen Stämmen der Gruppen A und B, nicht jedoch bei einigen G- und manchen C-Stämmen.

Für die Routinediagnostik bieten sich nach Ansicht des Autors die Coagglutination und die Latex-Agglutination als zuverlässige, rasche und wenig aufwendige Verfahren an.

GUINET u. Mitarb. (1982) stellten Untersuchungen zur serologischen Gruppierung von Streptokokken der Gruppen A,B,C,D,F und G mit Schnelltests an. In sechs Laboratorien wurden folgende Verfahren angewandt: Latex-Agglutination nach Pronase-Extraktion und nach Extraktion mit salpetriger Säure sowie Counterimmuno-electrophoresis nach Extraktion mit salpetriger Säure. Alle drei Methoden erlaubten bei der Mehrheit der Stämme eine richtige Gruppierung. Als

vorteilhafteste Methode wurde die Latex-Agglutination nach Extraktion mit salpetriger Säure herausgestellt, da sie einfach und schnell durchzuführen ist und bei der Extraktion mit salpetriger Säure wenig Kreuzreaktionen auftreten.

Achzig Streptokokkenstämme, in der Mehrzahl bovine Mastitisstreptokokken, gruppierte TANSKANEN (1980) serologisch mit einem Latex- und einem Coagglutinations-Testkit. Für den Latextest wurden die gruppenspezifischen Antigene aus Rein-kulturen, die auf Blutagar gewachsen waren, extrahiert. Im Coagglutinationstest wurde direkt die Nährbouillon eingesetzt. Wenn Kreuzreaktionen das Ablesen unmöglich machten, wurde der Überstand der Bouillon nach Zentrifugation verwendet.

Aufgrund der engen Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen der LANCEFIELD-Standardmethode hält der Autor die Schnellverfahren als ergänzende Methoden bei der Differenzierung von Streptokokken aus tierischem Material für praktisch anwendbar.

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Material

Insgesamt wurden 355 Streptokokkenisolate in die Untersuchungen einbezogen.

Die Streptokokkenisolate wurden vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. in Grub und in Kempten zur Verfügung gestellt.

Die auf Blut- oder EDWARDS-Platten übernommenen Kulturen wurden wiederum auf Blut- und EDWARDS-Platten überimpft und zur Gewinnung von Reinkulturen teilweise mehrfach subkultiviert.

Für die verschiedenen Untersuchungen wurden folgende Nährmedien verwendet:

Die Blutagarplatten wurden hergestellt mit 33g Tryptose Blood Agar Base der Fa. Difco pro Liter unter Zusatz von 0,1% Äskulin und 5% gewaschenen Rindererythrozyten.

Zusammensetzung von Tryptose Blood Agar Base (pro l):

Bacto-Tryptose	10g
Bacto Beef Extract	3g
Kochsalz	5g
Bacto Agar	15g

Die EDWARDS-Platten wurden hergestellt mit 41g EDWARDS-Medium (modified) der Firma Oxoid pro Liter unter Zusatz von 5% gewaschenen Rindererythrozyten.

Zusammensetzung von EDWARDS-Medium (modified):

Fleischextrakt LAB LEMCO	10 g/l
Pepton	10 g/l
Kochsalz	5 g/l
Äskulin	1 g/l
Kristallviolett	0,0013 g/l
Thalliumsulfat	0,33 g/l
Agar Nr.3	15 g/l

pH ca. 7,4

Für den CAMP-Test wurden die Blutagarplatten mit 40g DST-Agar der Fa. Oxoid unter Zusatz von 0,6g Äskulin pro Liter hergestellt.

Zusammensetzung von DST-Agar (Angaben in g/l):

Protease Pepton (Oxoid L46)	10,0
Getrockneter Aufguß vom Kalb	10,0
Traubenzucker	2,0
Kochsalz	3,0
Natriumphosphat	2,0
Natriumacetat	1,0
Adeninsulfat	0,01
Guaninhydrochlorid	0,01
Uracil	0,01
Xanthin	0,01
Aneurin	0,00002
Agar Nr.1 (Oxoid L11)	12,0

pH ca. 7,4

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Grundmedien auf ca. 50 °C erfolgte die Zugabe von 5% gewaschenen Rindererythrozyten.

Die Platten wurden 18-24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Zur Prüfung der Hippuratspaltung wurden 5ml Standard(2)-Bouillon (Art.Nr. 7884, Diagnostica Merck) mit einem Zusatz von 1% Natriumhippurat in Rundbodengläser gefüllt und 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

Zusammensetzung der Standard(2)-Bouillon (g/l demin. Wasser)

Spezialpepton	8,6
Kochsalz	6,4

pH der gebrauchsfertigen Nährlösung bei
37°C: 7.5

Das Pigmentbildungsvermögen wurde auf DMS-Medium geprüft.

DMS-Medium wird durch Zugabe von 1% Proteose Pepton Nr.3 (Difco) zu GC basal medium (Difco) hergestellt

Zusammensetzung des DMS - Mediums (Angaben in g/l):

Proteose Pepton	25
Stärke	1
Dikaliumhydrogenphosphat	4
Kaliumdihydrogenphosphat	1
Kochsalz	5
Agar	10

Bei 69 Stämmen wurde das Pigmentbildungsvermögen auch auf Columbia - Agar (Code CM 331, Oxoid) geprüft.

Zusammensetzung von Columbia Agar Base (Angaben in g/l):

Spezial Pepton (Oxoid L72)	23,0
Stärke	1,0
Kochsalz	5,0
Agar Nr.1 (Oxoid L11)	10,0

pH ca. 7,3

Columbia Agar Base wurde in demineralisiertem Wasser gelöst, in Rundbodengläser gefüllt und autoklaviert. Vor dem Erkalten und Erstarren des Agars wurden die Gläser schräg gelagert.

Folgende im Handel erhältliche Latex-Agglutinations-Tests wurden eingesetzt:

Strep B Diagnostic Products Corporation (Art.Nr.GK5MG)

Slidex Strepto B bioMerieux (Best.Nr. 58813)

Streptokokken-Identifizierungs-Test Oxoid (Nr. DR 585)

2.2. Methoden

Das Verhalten aller 355 Streptokokkenstämme im CAMP-Test und ihre Fähigkeit, Hippurat und Äskulin zu spalten, wurde untersucht. Ebenfalls bei allen Stämmen wurde das Pigmentbildungsvermögen in DMS-Medium (MERRITT und JACOBS 1976) geprüft. Weiterhin wurden 69 Stämme zur Feststellung des Pigmentbildungsvermögens auf Columbia-Agar angezüchtet.

Alle Streptokokkenstämme wurden mit einem Latex-Agglutinationstest (STREP B der Fa. Diagnostic Products Corporation) geprüft. Darüberhinaus wurden 68 Stämme mit zwei weiteren Latex-Agglutinationstests (Slidex Strepto B der Fa. bio Merieux und Streptokokken-Identifizierungs-Test der Fa. Oxoid) untersucht.

Streptokokkenstämme, bei denen der CAMP-Test oder der Agglutinationstest fraglich ausfielen oder das Ergebnis des CAMP-Tests nicht mit dem des Agglutinations-Tests übereinstimmte, wurden in der Streptokokken-Zentrale in Kiel auf ihre serologische Gruppenzugehörigkeit untersucht.

2.2.1. Hämolyseverhalten

Das Hämolyseverhalten der einzelnen Stämme wurde auf Rinderblutplatten entsprechend SEELEMANN (1954) beurteilt.

2.2.2. CAMP-Test

Der CAMP-Test wurde folgendermaßen durchgeführt:

Auf Blutagarplatten (DST-Agar) wurde ein Betatoxin- bildender Staphylokokkenstamm in einer geraden Linie durch den Mittelpunkt der Platte ausgestrichen.

Im rechten Winkel zum Staphylokokken-Impfstrich wurden die zu differenzierenden Streptokokkenstämme bis nahe an den Staphylokokkenstamm geimpft.

Auf einer Blutplatte wurden höchstens fünf Streptokokkenisolate ausgestrichen.

Die Auswertung erfolgte nach 18- 24 Stunden Bebrütung bei 37°C. Als positiv wurde das Auftreten einer schalenförmigen vollständigen Hämolyse im Bereich des Betatoxins gewertet. Anders geformte Zonen verstärkter Hämolyse wurden als fraglich bzw. negativ beurteilt.

2.2.3. Askulin-Spaltung

Die Askulin-Spaltung wurde direkt auf der Blutagarplatte, die 0,1% Askulin enthielt, beurteilt. In Zweifelsfällen wurden die Kolonien unter der UV-Lampe betrachtet.

Wenn Askulin- spaltende Stämme auf einer solchen Platte wachsen, verschwindet um die Kolonien die bläulich fluoreszierende Färbung und der Nährboden sowie die Kolonien selbst sind bräunlich gefärbt.

2.2.4. Hippurat-Spaltung

Zur Prüfung der Hippurat -Spaltung wurden die Streptokokken-isolate in 5ml Standard(2) - Bouillon (Merck) mit einem Zusatz von 1% Natriumhippurat angezüchtet.

Nach der Beimpfung wurde diese Bouillon drei Tage bei 37 °C bebrütet. Vom Überstand der bebrüteten Kultur wurde 1ml in ein kleineres Rundbodenglas pipettiert, 0,5ml der Reaktionslösung dazugegeben und gemischt.

Die Reaktionslösung enthält auf 100ml 12g Eisen^{III}-Chlorid und 0,2ml konzentrierte Salzsäure.

Die Ablesung erfolgte 10-15 Minuten nach der Zugabe der Reaktionslösung.

Als positiv wurde ein deutlicher, brauner Niederschlag aus unlöslichem Eisenbenzoat gewertet.

2.2.5. Pigmentbildung

Das Pigmentbildungsvermögen aller 355 Streptokokkenstämme wurde auf DMS-Medium (MERRITT und JACOBS 1976) geprüft. Dieser Nährboden zeigt eine weißliche Farbe.

69 Stämme wurden zur Untersuchung der Pigmentbildung zusätzlich auf Columbia-Agar kultiviert.

Von dem jeweiligen Nährmedium wurden 7ml in Rundbodengläser gefüllt.

Mit einer Impföse (Durchmesser etwa 1mm) wurde der zu untersuchende Streptokokkenstamm als Stichagar verimpft, und zwar vom äußeren Rand des Rundbodenglases zur Mitte zu, um

zartere Pigmentbildung gegen den oberen Rand zu besser beurteilen zu können.

Die beimpften Röhrchen wurden bei 37°C bebrütet und nach 24 und nach 48 Stunden auf Pigmentbildung untersucht.

Im positiven Fall war nach spätestens 48 Stunden eine schwach orangefarbene bis deutlich ziegelrot leuchtende Färbung der gewachsenen Kolonien und teilweise des umgebenden Nährbodens zu sehen.

Die Kulturröhrchen wurden gegen einen hellen Hintergrund bei Tageslicht betrachtet, um auch schwache Pigmentbildung erkennen zu können.

2.2.6. Latex- Agglutinations-Tests

Die Latex-Agglutinations-Tests wurden entsprechend den Vorschriften der Hersteller durchgeführt.

Strep B (Fa. Diagnostic Products Corporation)

Ein oder zwei Kolonien des zu untersuchenden Streptokokkenstammes wurden in zwei ml Nährbouillon aufgelöst. Für jede Probe und jede Kontrolle wurde ein Eppendorf-Gefäß beschriftet und jeweils ein Tropfen des aufgelösten Extraktionsreagenz 1 und des Extraktionsreagenz 2 hineingegeben. Dann wurden jeweils 100µl der Kontrollen und der vorbereiteten Nährlösungen, die die Streptokokken enthielten, in die entsprechenden beschrifteten Eppendorf-Gefäße pipettiert und gut gemischt. Anschließend

wurden die Proben entweder 30 Minuten bei Raumtemperatur oder 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder 5 Minuten bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Ein Tropfen von dem Extraktionsreagenz 3 wurde in die Testgefäße gegeben und wiederum gut gemischt. Danach wurden die Gefäße 10 Minuten bei 1500g zentrifugiert und der flüssige Überstand für den Latex-Agglutinations-Test verwendet.

Jeweils 50 µl der Probenextrakte sowie der positiven und negativen Kontrollen wurden auf einer mitgelieferten Glasplatte mit einem Tropfen Strep B Latex-Reagenz sowie mit einem Tropfen Kontroll-Latex mit einem Holzspatel gemischt.

Strep B Latex-Reagenz enthält Immunglobulin G, das spezifisch für Streptokokken der serologischen Gruppe B ist, an Latex-Partikel gebunden. Kontroll-Latex enthält Ig G vom Kaninchen, das nicht spezifisch für B-Streptokokken ist, ebenfalls an Latex-Partikel gebunden.

Die Glasplatte wurde 30 Sekunden lang unter einer Lichtquelle gegen einen dunklen Hintergrund gehalten und dabei geschwenkt.

Agglutinationen, die deutlich stärker ausfielen als die teilweise zu beobachtenden sehr schwachen Agglutinationen mit Kontroll-Latex, wurden als positiv gewertet. Schwache Agglutinationen wurden als fraglich gewertet.

Slidex Strepto B (Fa. bio Merieux)

Zwei bis drei Ösen einer Reinkultur des zu untersuchenden Streptokokkenstammes wurden in 0,4ml Enzymlösung (Pronase) in einem Eppendorf-Gefäß für die Extraktion der gruppenspezifischen Antigene zu einer dichten Emulsion aufgeschwemmt und eine Stunde im Wasserbad bei 56 °C inkubiert. Zur Gewinnung des Überstandes, der den Extrakt darstellt, wurde die Emulsion 10 Minuten bei 1200g zentrifugiert.

Auf einem Objektträger wurde neben einen Tropfen der gut homogenisierten Latex-Suspension ein Tropfen des Extraktes mit Hilfe einer Pasteur-Pipette aufgetragen, die beiden Tropfen mit einem Rührspatel gemischt und der Objektträger leicht rotierend bewegt.

Die Reaktion wurde gegen einen schwarzen Hintergrund abgelesen. Eine positive Agglutination wurde in weniger als 30 Sekunden als Verklumpung der Latex-Partikel sichtbar. Als negativ wurde eine ausbleibende oder nur sehr feine Agglutination gewertet.

Streptokokken-Identifizierungs-Test (Fa. Oxoid)

Mindestens zwei Kolonien von einer über Nacht bebrüteten Blutagarplatte wurden mit Hilfe einer Öse in 0,4ml der Extraktionsenzymlösung in einem Eppendorf-Gefäß emulgiert. Dieses Gemisch wurde 10 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Der fertige Extrakt wurde auf einem Objektträger mit Hilfe eines Rührstäbchens mit einem Tropfen Latex-Reagenz ver-

mischt.

Im positiven Fall war die auftretende Agglutination auf dem vorsichtig hin- und hergeschwenkten Objektträger innerhalb von 30 Sekunden sichtbar.

2.3. Ergebnisse

2.3.1. Hämolyseformen

Von allen 355 untersuchten Streptokokkenisolaten wurde das Hämolyseverhalten bestimmt. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

alpha -Hämolyse:	117 Stämme
alpha' -Hämolyse:	73 Stämme
beta -Hämolyse:	31 Stämme
gamma -Hämolyse:	134 Stämme

2.3.2. Äskulin-Spaltung

325 Stämme waren Äskulin-negativ, 30 Stämme spalteten Äskulin.

2.3.3. CAMP-Test

Im CAMP-Test reagierten die 355 untersuchten Stämme folgendermaßen:

174 Stämme waren CAMP-positiv, 174 Stämme verhielten sich negativ im CAMP-Test und bei sieben Stämmen war das Ergebnis fraglich.

Abbildung 1 A zeigt die typischen Formen der Hämolysezonen bei CAMP-positiven B-Streptokokken: Die CAMP-Zonen sind schalenförmig, wobei die Krümmungsradien unterschiedlich groß sein können. Am Rand des Betatoxinbereiches ist die Hämolysezone am breitesten (A1, A2) oder in einem Teil der Fälle geringfügig eingezogen (A3). Die Grenze zwischen CAMP-Zone und unverändertem Blutagar ist stets eine gerade Linie. Die Ränder der CAMP-Zone sind scharf. Als fraglich wurde das Ergebnis des CAMP-Testes beurteilt, wenn die Zone der Hämolyseverstärkung im Bereich des Staphylokokken-Betatoxins nicht typisch schalenförmig war. Die Form der CAMP-Zonen bei diesen fraglichen Ergebnissen zeigt Abbildung 1 B: Die typische Schalenform scheint durch eine runde, bzw. ovale Figur mit unterschiedlichem Radius überlagert zu sein (B1, B2, B3).

Ebenfalls als fraglich wurde eine Hämolysezone beurteilt, die sich von der Schalenform dadurch unterschied, daß sie sich in der Peripherie deutlich verjüngte (B4).

Teilweise auftretende runde oder rechteckig geformte Zonen verstärkter Hämolyse im Bereich des Staphylokokken-Betatoxins wurden als CAMP-negativ gewertet.

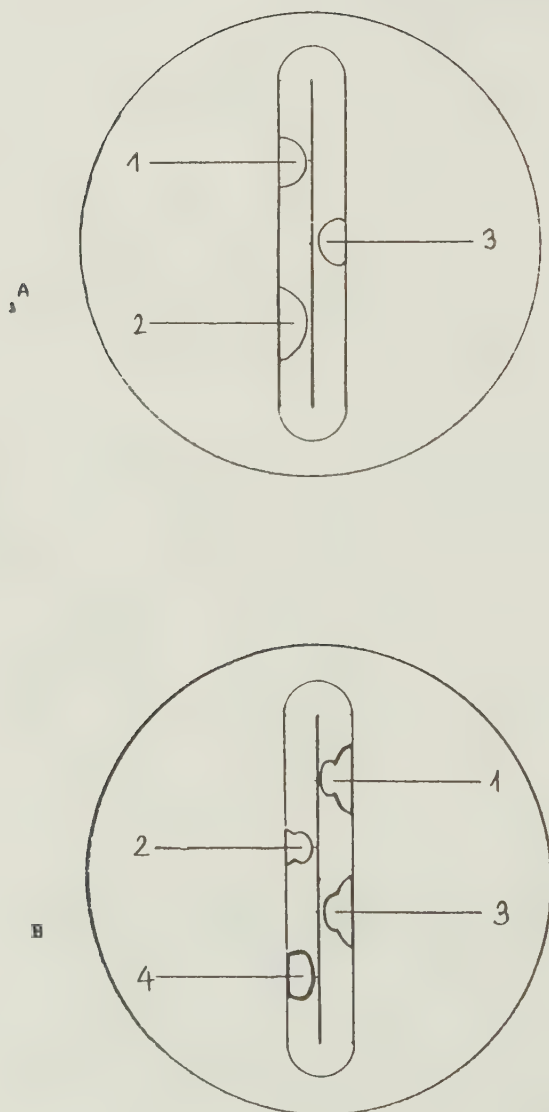


Abb.1: Formen der Hämolysezonen im CAMP-Test

(Erklärung im Text S.69)

2.3.4. Hippurat-Test

221 Stämme spalteten Hippurat, 134 reagierten negativ.

2.3.5. Pigmentbildung

Bei allen untersuchten Stämmen wurde das Pigmentbildungsvermögen in DMS-Medium nach 24 Stunden Bebrütung geprüft.

Wenn nach 24 Stunden kein Pigment zu erkennen war, wurde nach weiteren 24 Stunden Bebrütung nachuntersucht.

Die Intensität der Pigmentbildung wurde als schwach (+), deutlich (++) oder stark (+++) eingestuft.

Folgende Ergebnisse waren zu verzeichnen:

Alle 30 Äskulin-positiven Stämme bildeten kein Pigment.

Von den 325 Äskulin-negativen Stämmen waren

226 negativ in Bezug auf Pigmentbildungsvermögen

99 positiv in Bezug auf Pigmentbildungsvermögen.

Tab.2: Intensität der Pigmentbildung bei 99 pigmentbildenden Stämmen

Pigmentbildung	nach 24h			nach 48h Bebrütung		
	+	++	+++	+	++	+++
	46	11	20	21	1	

Das Pigmentbildungsvermögen von 69 Stämmen wurde auch in Columbia-Agar geprüft.

59 dieser Stämme gehörten zur serologischen Gruppe B.

Die zehn Stämme, die nicht der serologischen Gruppe B angehörten, zeigten keine Pigmentbildung.

Von den 59 B-Streptokokkenstämmen bildeten 36 kein Pigment und 23 Stämme bildeten Pigment.

In DMS-Medium bildeten 13 der 36 B-Streptokokkenstämmen, die in Columbia-Agar negativ waren, Pigment. Sieben dieser Stämme zeigten auch in DMS-Medium erst nach 48 Stunden erkennbare Pigmentbildung.

In DMS-Medium bildeten also 36,1% der B-Streptokokkenstämmen, die in Columbia-Agar negativ reagiert hatten, Pigment.

2.3.6. Latex - Agglutinations - Test

Alle 355 untersuchten Streptokokkenstämmen wurden mit dem Strep B Latex-Agglutinations-Test der Fa.Diagnostic Products Corporation geprüft.

Die Ergebnisse wurden als positiv, negativ oder fraglich interpretiert.

Bei den fraglichen Stämmen war nur eine sehr schwache Agglutination festzustellen. Diese fraglichen Reaktionen waren kaum deutlicher als die sehr schwache, feinkörnige Agglutination, die der Kontroll-Latex öfters hervorrief.

183 Stämme reagierten positiv

168 Stämme reagierten negativ

4 Stämme reagierten fraglich

Von den 183 Stämmen, die mit dem Strep B-Test positiv reagierten, waren zwei Askulin-positiv und 181 Askulin-negativ.

68 Streptokokkenstämme wurden mit zwei weiteren im Handel erhältlichen Latex-Agglutinations-Tests untersucht (Slidex Strepto B der Fa. bio Merieux und Streptokokken-Identifizierungstest der Fa. Oxoid).

Die Ergebnisse dieser beiden Tests stimmten bei den untersuchten 68 Stämmen vollkommen überein:

47 Stämme reagierten in beiden Tests positiv, 21 Stämme reagierten in beiden Tests negativ, fragliche Ergebnisse traten nicht auf.

3. Diskussion

Die Mastitisstreptokokken der serologischen Gruppe B werden derzeit in den Untersuchungslaboratorien allgemein mit Hilfe des CAMP-Tests differenziert. Wie in der Literatur mehrfach erwähnt, sind jedoch die Ergebnisse des CAMP-Tests nicht immer spezifisch für B-Streptokokken: es wird über unterschiedliche Anteile CAMP-negativer B-Streptokokken und CAMP-positiver Streptokokken anderer Serogruppen berichtet.

Durch die eigenen Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob im Handel erhältliche Latex-Agglutinationstests zum CAMP-Test eine alternative Untersuchungsmöglichkeit für B-Streptokokken in der Milch darstellen.

Es wurden 355 Streptokokkenstämme sowohl mit einem im Handel erhältlichen Latex-Agglutinations-Test, als auch mit dem CAMP-Test und dem Hippurattest untersucht. Ferner wurden Hämolyseverhalten, Äskulinspaltung und Pigmentbildungsvermögen beurteilt. Darüberhinaus wurden 68 Stämme mit zwei weiteren im Handel erhältlichen Latex-Agglutinations-Tests geprüft.

Als Streptokokken der serologischen Gruppe B wurden diejenigen Stämme angesehen, die sowohl im CAMP-Test als auch im Agglutinationstest übereinstimmend positiv reagierten.

Diejenigen Stämme, die in beiden Tests negativ reagierten, wurden als "Serogruppen, andere als B" eingestuft und nicht näher klassifiziert.

Stämme, deren Resultate im CAMP-Test und im Latex-Agglutinations-Test unterschiedlich ausfielen bzw. die in einem Test fraglich reagierten, wurden zur Sicherung der Diagnose in der Streptokokkenzentrale in Kiel auf ihre serologische Gruppenzugehörigkeit untersucht.

Auf Grund der Ergebnisse im CAMP-Test und im Strep B-Latex-Agglutinations-Test wurden 170 Stämme als B-Streptokokken und 165 Stämme als "Nicht B-Streptokokken" identifiziert.

Wegen unterschiedlicher oder fraglicher Ergebnisse wurden 20 Stämme in der Streptokokkenzentrale in Kiel differenziert. Davon erwiesen sich 13 Stämme als B-Streptokokken.

Insgesamt wurden also 183 Streptokokkenstämme als Angehörige der serologischen Gruppe B identifiziert.

Die Untersuchung des Hämolyseverhaltens der 183 B-Streptokokken ergab folgende Resultate:

Alpha'-Hämolyse zeigten 37,2%, Beta-Hämolyse 1,1% und Gamma-Hämolyse 61,7% der B-Streptokokken.

Tab.3: Hämolyseformen der 183 Streptokokken der serologischen Gruppe B

B-Streptokokken	
alpha -Hämolyse	-
alpha'-Hämolyse	68 (37,2%)
beta -Hämolyse	2 (1,1%)
gamma -Hämolyse	113 (61,7%)

RICHTER-MEERWALD (1980) hatte bei ihren Untersuchungen boviner B-Streptokokken nur alpha'- und gamma-hämolysierende Stämme festgestellt.

Tab.4: Verhalten der 355 untersuchten Streptokokkenstämmen im CAMP-Test und ihr Äskulinspaltungsvermögen

	Äskulinspaltung	
	positiv	negativ
CAMP positiv	2	172
CAMP negativ	28	146
CAMP fraglich	-	7

Von den 174 Stämmen, die im CAMP-Test positiv reagierten, waren 172 Äskulin-negativ und zwei Äskulin-positiv. Von den 172 Äskulin-negativen Stämmen wurden auf Grund der übereinstimmenden Ergebnisse im CAMP- und im Agglutinations-Test 170 als B-Streptokokken identifiziert. Die zwei übrigen CAMP-positiven, Äskulin-negativen Stämme wurden in der Streptokokkenzentrale in Kiel als Streptokokken der serologischen Gruppe B identifiziert.

Bei den zwei Äskulin-positiven Stämmen, die im CAMP-Test positiv reagierten, handelte es sich um Streptokokken der Gruppe E (Streptokokkenzentrale Kiel). Diese beiden E-Streptokokkenstämmen waren die einzigen Stämme, die im CAMP-Test falsch-positive Ergebnisse erbrachten.

Dies stimmt mit den Beobachtungen von BEERWERTH und KÖSER (1965) überein, wonach 88% der E-Streptokokken im CAMP-Test positiv reagieren.

Die sieben Äskulin-negativen Stämme, deren Ergebnisse im CAMP-Test fraglich ausfielen, wurden in der Streptokokkenzentrale in Kiel als B-Streptokokken identifiziert.

Es wird deutlich, daß ein positives Ergebnis im CAMP-Test bei Äskulin-negativen Streptokokken die Eingruppierung in die serologische Gruppe B rechtfertigt, da aus keiner anderen Gruppe Äskulin-negative Stämme positiv im CAMP-Test reagierten.

Tab.5: CAMP-Test und Hippurat-Spaltung bei Äskulin-negativen Streptokokkenstämmen

	CAMP-Test		
	positiv	negativ	fraglich
Hippurat-Test			
positiv	156	42	7
negativ	16	104	-

Von den 172 Äskulin-negativen, CAMP-positiven Streptokokken reagierten 156 (90,7%) positiv und 16 (9,3%) negativ im Hippurat-Test. Die sieben im CAMP-Test fraglichen B-Streptokokkenstämme spalteten Hippurat. Auch 42 Äskulin-negative, CAMP-negative Stämme spalteten Hippurat. Sowohl im

CAMP-Test als auch im Hippurat-Test reagierten 104 Stämme negativ.

Zwar spaltete mit 90,7% ein hoher Anteil der CAMP-positiven B-Streptokokken Hippurat, jedoch wird die Aussagekraft dieses Suchtests dadurch gemindert, daß neben den B-Streptokokken auch Streptokokken anderer serologischer Gruppen Hippuratspaltung aufweisen können.

In den eigenen Untersuchungen zeigten 99 der 183 B-Streptokokkenstämme (54,1%) Pigmentbildungsvermögen in DMS-Medium. Die Qualität des von den verschiedenen Stämmen gebildeten Pigments war unterschiedlich. Das Spektrum reichte von einer schwach orangefarbenen bis zu einer starken ziegelroten Pigmentierung der Kolonien, die im Agarröhrchen gewachsen waren. Von den 99 positiven Stämmen konnte bei 22 erst nach 48 stündiger Bebrütung Pigmentbildung nachgewiesen werden. Kontrollen nach noch längerer Inkubation führten nicht zur Entdeckung weiterer pigmentbildender Stämme.

Tab.6: Hämolyseverhalten der 99 pigmentbildenden B-Streptokokkenstämme

	Pigmentbildung					
	nach 24h			nach 48h		
	+	++	+++	+	++	+++
Hämolyse						
alpha	-	-	-	-	-	
alpha'	18	5	13	12	1	
beta	-	-	-	-	-	
gamma	28	6	7	9		

Von den 99 pigmentbildenden Stämmen waren 49 (49,5%) alpha'-hämolsierend und 50 (50,5%) gamma-hämolsierend. Genauere Auskunft über das Hämolyseverhalten der unterschiedlich deutlich pigmentbildenden Stämme gibt Tabelle 6.

In der Literatur wird mehrfach der Zusammenhang zwischen Hämolysefähigkeit und Pigmentbildungsvermögen von B-Streptokokken erwähnt (TAPSALL 1986, WAITKINS 1982).

LANCEFIELD (1934) berichtete über einen B-Streptokokkenstamm, der nach Passagen über Mäuse Hämolysefähigkeit und Pigmentbildungsvermögen verlor.

Nach NOBLE u. Mitarb. (1983) legt der Zusammenhang zwischen Pigmentbildungsvermögen und Hämolysinproduktion die Vermutung nahe, daß die Genloci, die diese beiden Eigenschaften determinieren, eng verbunden sind.

Andererseits berichten NOBLE u. Mitarb. (1983) über einen B-Streptokokkenstamm, der nach wiederholter Überimpfung sein Pigmentbildungsvermögen einbüßte, während die Hämolyseproduktion erhalten blieb. Ebenso bilden nicht alle beta-hämolysierenden Stämme Pigment.

ISLAM (1977) konnte bei seinen Untersuchungen bei drei von zehn nicht-hämolysierenden B-Streptokokken aus Material von Tieren Pigmentbildung nachweisen.

JEWES und JONES (1986) berichteten über Untersuchungsergebnisse, wonach 94% humaner B-Streptokokken orangefarbenes Pigment produzierten. B-Streptokokken bovinen Ursprungs dagegen produzierten nur in 48% der Fälle Pigment.

RICHTER-MEERWALD (1980) konnte bei 84% boviner B-Streptokokken Pigmentbildung in Columbia-Agar nachweisen.

Möglicherweise ist der relativ geringe Prozentsatz pigmentbildender Stämme in den eigenen Untersuchungen darauf zurückzuführen, daß ein Teil der Stämme im Verlauf mehrerer Überimpfungen die Fähigkeit, in den verwendeten Nährböden Pigment zu bilden, verloren hat.

Bei 59 B-Streptokokkenstämmen wurde das Pigmentbildungsvermögen in DMS-Medium und in Columbia-Agar verglichen. Dabei ergab sich, daß in DMS-Medium 36,1% der Stämme, die in Columbia-Agar keine Pigmentbildung gezeigt hatten, positiv waren.

Tab.7: Verhalten der 355 Streptokokkenstämme im CAMP-Test und im Strep B Latex-Agglutinations-Test

	Latex-Agglutination		
	positiv	negativ	fraglich
CAMP-Test			
positiv	170	3	1
negativ	6	165	3
fraglich	7	-	-

Von den untersuchten 355 Streptokokkenstämmen wurden 170 auf Grund der übereinstimmenden, positiven Ergebnisse von CAMP-Test und Latex-Agglutination als Angehörige der serologischen Gruppe B identifiziert, d.h. 92,9% der 183 B-Streptokokken konnten auf Grund der übereinstimmenden Ergebnisse von CAMP- und Agglutinationstest differenziert werden.

165 Stämme reagierten in beiden Tests negativ und wurden als "Nicht- B-Streptokokken" angesprochen und nicht genauer klassifiziert.

Die übrigen 20 Stämme ergaben unterschiedliche bzw. fragliche Ergebnisse und konnten deshalb nur auf Grund von CAMP-Test und Latex- Agglutination nicht sicher differenziert werden.

Die serologische Eingruppierung dieser 20 Stämme wurde in der Streptokokkenzentrale in Kiel durchgeführt.

Serogruppendiagnose der Streptokokkenzentrale Kiel von 20 Stämmen, die im CAMP-Test und im Strep B-Test unterschiedlich reagierten:

CAMP + Strep B-Test - : 1xB, 2xE

CAMP + Strep B-Test ? : 1xB

CAMP - Strep B-Test + : 4xB, 1xP, 1 nicht gruppierbar

CAMP - Strep B-Test ? : 1xC, 1xL, 1 Streptococcus milleri

CAMP ? Strep B-Test + : 7xB

Zwei Äskulin-positive Stämme reagierten im CAMP-Test falsch positiv und zeigten mit dem Strep B Latex-Agglutinations-Test keine Reaktion. Sie erwiesen sich als Streptokokken der Gruppe E.

Ein falsch-negatives Ergebnis im Agglutinations-Test erbrachte ein Stamm der serologischen Gruppe B (= 0,55% der B-Streptokokken).

Ein weiterer B-Streptokokkenstamm ergab mit dem Strep B-Test ein fragliches Ergebnis.

Drei Stämme, die im Agglutinationstest fraglich reagierten, konnten als ein C-Stamm, ein L-Stamm und ein Streptococcus milleri identifiziert werden.

Falsch positiv reagierte der Agglutinations-Test mit einem Stamm der serologischen Gruppe P und einem nicht eingruppierten Stamm. Diese beiden Stämme waren Äskulin-positiv.

Im CAMP-Test negativ reagierten vier der 183 B-Streptokokkenstämme (=2,19%).

Alle sieben CAMP-fraglichen Stämme (=3,82% der B-Streptokokken) konnten als B-Streptokokken identifiziert werden.

Tab. 8: Falsche und fragliche Ergebnisse von CAMP-Test und Latex-Agglutinations-Test

	falsch +	falsch -	fraglich, eigentlich	
			+	-
CAMP-Test	2	4	7	0
Agglutination	2	1	1	3

Sowohl im CAMP-Test als auch im Strep B-Test hatten jeweils zwei Äskulin-positive Nicht-B-Streptokokken falsch positiv reagiert.

Beide Tests rechtfertigen bei positiver Reaktion Äskulin-negativer Streptokokken die Identifizierung als B-Streptokokken.

Während im CAMP-Test vier B-Streptokokken nicht reagierten, war im Agglutinations-Test nur ein Stamm falsch-negativ.

Auf Grund untypisch geformter Hämolysezonen im CAMP-Test war das Ergebnis bei sieben B-Streptokokkenstämmen als fraglich beurteilt worden.

Im Agglutinations-Test reagierte ein B-Streptococcus und drei Stämme, die nicht der Gruppe B angehörten mit fraglichem Ergebnis.

Die insgesamt untersuchten 183 Streptokokkenstämme der serologischen Gruppe B erbrachten in den einzelnen Tests folgende Ergebnisse:

172 Stämme waren CAMP-positiv, vier CAMP-negativ und sieben fraglich im CAMP-Test. Hippurat spalteten 167 Stämme, 16 spalteten Hippurat nicht. Pigment bildeten 99 Stämme, 84 besaßen kein Pigmentbildungsvermögen.

Im Strep B Latex-Agglutinations-Test waren 181 positiv, ein Stamm reagierte negativ und bei einem anderen war das Ergebnis fraglich.

Tab. 9: Ergebnisse der 183 B-Streptokokkenstämme im CAMP-Test, im Hippurat-Test, bei der Pigmentbildung und im StrepB Latex- Agglutinations-Test

Von den 183 B-Streptokokken reagierten

CAMP-positiv	172	(93,99%)
CAMP-negativ	4	(2,19%)
CAMP-fraglich	7	(3,82%)
Hippurat positiv	167	(91,26%)
Hippurat negativ	16	(8,74%)
Pigmentbildung positiv	99	(54,10%)
Pigmentbildung negativ	84	(45,90%)
Strep B positiv	181	(98,91%)
Strep B negativ	1	(0,55%)
Strep B fraglich	1	(0,55%)

Mit über 98% positiv reagierenden B-Streptokokken zeigte sich der Strep B Latex-Agglutinations-Test dem Standard-CAMP-Test bei der Identifizierung von B-Streptokokken überlegen.

Bemerkenswert ist, daß nur einer der vier Stämme, die im CAMP-Test negativ beurteilt wurden, überhaupt keine Hämolyse im Betatoxinbereich des Staphylococcus aureus zeigte. Die drei anderen, CAMP-negativen Stämme zeigten im Betatoxinbereich nur kleine, runde Hämolysezonen.

Sowohl im Latex-Agglutinations-Test als auch im CAMP-Test traten bei Äskulin-negativen Streptokokken keine falsch positiven Ergebnisse auf.

Im Hippurat-Test reagierten über 91% der B-Streptokokken positiv. Jedoch erlaubt nach den eigenen Untersuchungen ein positives Ergebnis in diesem Test nicht die Eingruppierung in die serologische Gruppe B, da auch Streptokokken anderer serologischer Gruppen Hippurat spalten können.

Pigmentbildung in DMS-Medium zeigten in den eigenen Untersuchungen nur 54,1% der B-Streptokokken. Angehörige anderer Serogruppen bildeten in keinem Fall Pigment.

Nach mehreren Überimpfungen auf EDWARDS- und Blutagarplatten wurden die 20 Stämme, die im CAMP-Test und im Strep B-Test unterschiedlich reagiert hatten und deshalb in der Streptokokkenzentrale in Kiel serologisch eingruppiert worden waren, erneut im CAMP- und im Strep B-Test geprüft.

Ergebnisse von CAMP- und Strep B-Test bei der Nachuntersuchung:

	CAMP +	CAMP-
Strep B +	12	1
Strep B -	2	5

Es war nur noch bei drei Stämmen ein unterschiedliches Ergebnis festzustellen. Fragliche Reaktionen traten weder im CAMP-, noch im Strep B-Test auf.

Serogruppenzugehörigkeit der nachuntersuchten Stämme:

CAMP+ Strep B+: 12x B
CAMP+ Strep B-: 2x E
CAMP- Strep B+: 1x B
CAMP- Strep B-: 1x C, 1x L, 1x P, 1x Streptococcus
milleri, 1x nicht eingruppierbar

Drei der vier B-Streptokokkenstämme, die beim ersten CAMP-

Alle sieben CAMP-fraglichen B-Streptokokkenstämme zeigten ein deutliches CAMP-Phänomen.

Bei den beiden Askulin-positiven Stämmen, die ursprünglich im Latex-Test positiv reagiert hatten, trat keine Agglutination mehr auf.

Alle Streptokokkenstämme der serologischen Gruppe B reagierten mit dem Strep B Latex-Agglutinations-Test eindeutig positiv.

Die Stämme der Gruppe C und L sowie der Streptococcus milleri-Stamm, die bei der ersten Untersuchung im Agglutinations-Test ein fragliches Ergebnis erbracht hatten, reagierten negativ im Agglutinations-Test.

Weiterhin falsch positiv im CAMP-Test und negativ im Agglutinationstest waren die beiden Stämme der Serogruppe E.

Ein Stamm der Gruppe B bewirkte nach wie vor überhaupt keine Veränderung im Betatoxinbereich im Sinne eines CAMP-Phänomens.

Mit zwei weiteren Latex-Agglutinations- Tests (Slidex Strepto B der Fa. bio Merieux und Streptokokken-Identifizierungstest der Fa.Oxoid) sowie im CAMP-Test wurden 68 Isolate geprüft.

Die Ergebnisse beider Tests stimmten vollkommen überein.

Verhalten von 68 Streptokokkenstämmen im CAMP-Test, Slidex Strepto B und im Streptokokken-Identifizierungstest:

Agglutinationstests			
CAMP-Test	+	-	?
+	46	2	-
-	1	19	-
?	-	-	-

46 B-Streptokokkenstämme reagierten in den Agglutinations-Tests und im CAMP-Test positiv.

19 Streptokokkenisolate anderer Serogruppen reagierten in keinem der Tests positiv.

Bei den beiden Stämmen, die im CAMP-Test positiv und in den Agglutinations-Tests negativ reagierten, handelte es sich um Streptokokken der Gruppe E.

Der eine Stamm, der in den Agglutinations-Tests positiv, im CAMP-Test negativ reagierte, gehörte zur serologischen Gruppe B.

Nach HAHN (1981) beruht die Identifizierung der Spezies *Streptococcus agalactiae* auf wenigen charakteristischen Merkmalen:

Positiver CAMP-Test, Präzipitation mit Gruppe B-Serum, Hydrolyse von Natrium-Hippurat und fehlende Spaltung von Askulin.

HAHN (1981) hält den positiven CAMP-Test bei der Isolierung von Keimen aus der Milchdrüse des Rindes für ein hinreichendes Kriterium zur Sicherung der Diagnose Galtstreptokokken.

In den eigenen Untersuchungen reagierten 93,99% der B-Streptokokken beim ersten CAMP-Test positiv. 2,19% der Streptokokken dieser serologischen Gruppe zeigten entweder keine Verstärkung der Hämolyse im Sinne eines CAMP-Phänomens oder aber die Zone der Hämolyseverstärkung war völlig untypisch geformt. 3,82% der B-Streptokokken zeigten anfangs eine Hämolyseverstärkung im Bereich des Staphylokokken Betatoxins von nicht CAMP-typischer Form, was als fragliches Ergebnis des CAMP-Tests gewertet wurde.

Nach mehreren Überimpfungen auf EDWARDS- oder Blutagarplatten zeigten alle Stämme, die beim ersten Test fraglich reagiert hatten, ein typisches CAMP-Phänomen. Nur einer der ursprünglich vier CAMP-negativen Stämme blieb negativ.

Diese Veränderung im CAMP-Verhalten bei B-Streptokokken stimmt mit der Beobachtung von BEERWERTH und KÖSER (1965) überein, daß ursprünglich CAMP-negative B-Streptokokken nach mehrmaliger Überimpfung positiv im CAMP-Test reagierten.

KUNTER (1967) und STÖPPLER und HARR (1977) wiesen darauf hin, daß B-Streptokokken aus mit Penicillin-Präparaten behandelten Beständen nur schwach positiv bzw. negativ im CAMP-Test reagierten.

Nach ein oder zwei Passagen auf Hammelblutagar zeigten diese B-Streptokokkenstämme deutlich ausgeprägte CAMP-Reaktionen (KUNTER 1967).

Der CAMP-Test erwies sich in den vorliegenden Untersuchungen als zuverlässiger Suchtest für die Differenzierung von Mastitisstreptokokken der Gruppe B.

Da nur Streptokokkenstämme der serologischen Gruppe E falsch positiv im CAMP-Test reagierten, ist eine positive CAMP-Reaktion bei Äskulin-negativen Streptokokken als hinreichendes Kriterium für die Eingruppierung in die Gruppe B zu werten.

Stämme, die im CAMP-Test fraglich reagieren, d.h. bei denen die Zone der Hämolyseverstärkung untypisch geformt ist, sollten nochmals im CAMP-Test untersucht oder serologisch nachuntersucht werden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei der ersten CAMP-Testung teilweise nur kleine, runde Zonen einer Hämolyseverstärkung im Betatoxinbereich auftreten können, wie sie auch von anderen Keimen hervorgerufen werden.

Die Fähigkeit der B-Streptokokken, Natrium-Hippurat hydrolytisch in Benzoesäure und Glycin spalten zu können, gehört nach HAHN u. Mitarb. (1970) zu den wichtigsten biologischen Merkmalen dieser serologischen Gruppe.

Bei den eigenen Untersuchungen spaltete mit 91,26% ein großer Teil der B-Streptokokken Na-Hippurat. Sowohl die vier CAMP-negativen als auch die sieben CAMP-fraglichen B-Streptokokkenstämme reagierten im Hippurat-Test positiv.

Da jedoch auch Mastitisstreptokokken anderer serologischer Gruppen in der Lage sind, Na-Hippurat zu spalten, erscheint der Wert dieses drei Tage dauernden Tests im Verhältnis zum Aufwand und der Zeitdauer, die er benötigt, für die Identifizierung von B-Streptokokken relativ gering.

RICHTER-MEERWALD (1980) konnte bei ihren Untersuchungen bei einem hohen Prozentsatz (84%) der bovinen B-Streptokokken Pigmentbildung nachweisen.

Mit 54,1% der B-Streptokokken bildete bei den eigenen Untersuchungen ein vergleichsweise geringer Anteil orangefarbenes oder rotes Pigment.

Bei vergleichenden Untersuchungen des Pigmentbildungsvermögens bei 69 B-Streptokokkenstämmen in verschiedenen Medien, konnten in DMS-Medium (MERITT und JACOBS 1976) 36,1% mehr pigmentbildende Stämme nachgewiesen werden als in Columbia-Agar (FALLON 1974).

Auf Grund des geringen Anteils pigmentbildender B-Mastitis-Streptokokken kann nach den eigenen Untersuchungen die Prüfung des Pigmentbildungsvermögens als Suchtest für die Differenzierung von Galtstreptokokken nicht empfohlen werden.

Mit dem Strep B Latex-Agglutinations-Test (Diagnostic Products Corporation) konnten 98,81% der 183 Stämme der serologischen Gruppe B identifiziert werden.

Ein B-Streptokokkenstamm reagierte negativ und ein Stamm fraglich bei der Latex-Agglutination.

Zwei Äskulin-positive Stämme reagierten in diesem Test bei der ersten Durchführung falsch positiv und drei Stämme, die nicht der serologischen Gruppe B angehörten, reagierten fraglich.

Nach einigen Passagen auf EDWARDS- und Blutagarplatten konnte das Ergebnis verbessert werden: Alle B-Streptokokkenstämme reagierten eindeutig positiv. Die zwei ursprünglich positiven Äskulin spaltenden Stämme der serologischen Gruppe P und der von der Streptokokkenzentrale in Kiel nicht eingruppierbare Stamm zeigten keine Agglutination mehr.

Die Stämme der Serogruppen C und L und der Streptococcus milleri-Stamm, die ursprünglich zu einem fraglichen Ergebnis geführt hatten, zeigten keine Agglutinationen bei diesem Test.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die falschen und fraglichen Resultate bei dem Strep B Latex-Agglutinations-Test wohl im Wesentlichen darauf zurückzuführen sind, daß die untersuchten Kulturen nicht völlig frei waren von Verunreinigungen durch Streptokokken anderer serologischer Gruppen.

Bei der Differenzierung von 68 Streptokokkenstämmen, davon 47 B-Streptokokken, konnten mit dem Slidex Strepto "B" (bio Merieux) und dem Streptokokken-Identifizierungstest (Oxoid) alle Stämme der serologischen Gruppe B richtig eingruppiert werden. Falsch positive Ergebnisse waren nicht zu verzeichnen.

Als Material für die Durchführung der Latex-Agglutinations-Tests wurden wenige Kolonien von einer über Nacht bebrüteten EDWARDS- oder Blutagarplatte verwendet, die mit Milch euterkranker Kühe oder mit Milch aus galtverdächtigen Beständen bebrütet worden war.

Die Zeit, die für die Durchführung der untersuchten Latex-Agglutinations-Tests benötigt wird, richtet sich v.a. danach, wie lange die Proben für die Extraktion der gruppenspezifischen Polysaccharide inkubiert werden müssen bzw. welche Art der Inkubation gewählt wird (Strep B).

Die serologische Gruppierung mit dem Strep B erfordert eine Inkubation der Proben entweder von 30 Minuten bei Raumtemperatur, 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder einer Minute bei 56- 100°C im Heizblock oder im Wasserbad. Nach der Extraktion müssen die Proben entweder eine Minute in einer Mikrofuge oder 10 Minuten bei mindestens 1500g zentrifugiert werden.

Der Slidex Strepto B (bioMerieux) Latex-Agglutinations-Test benötigt für die Extraktion mit Pronase eine einstündige Inkubation bei 56°C im Wasserbad. Anschließend muß 10 Minuten bei 1200g zentrifugiert werden.

Der Streptokokken-Identifizierungstest (Oxoid) zeichnet sich durch besonders schnelle und einfache Durchführung aus.

Für die Extraktion genügt eine 10 minütige Inkubation bei 37°C. Eine Zentrifugation der Proben wird nicht durchgeführt.

Die Information, ob es sich bei verdächtigen Kolonien tatsächlich um Galtstreptokokken handelt, kann also am Tag nach dem Ansetzen einer bakteriologischen Untersuchung vorliegen, was im Vergleich zum Standard-CAMP-Test einen Zeitgewinn von einem Tag ausmacht.

Es zeigte sich, daß die Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B aus der Milch mit den hier untersuchten, im Handel erhältlichen Latex-Agglutinations-Tests mit großer Sicherheit durchgeführt werden kann. Das Ablesen der allermeisten Ergebnisse ist eindeutig möglich und bereitet auch ohne Erfahrung keine Schwierigkeiten. Lediglich beim Strep B-Test traten in weniger als einem Prozent der Fälle fragliche Ergebnisse auf.

Auf Grund der hohen diagnostischen Sicherheit der untersuchten Tests sowie ihrer einfachen und schnellen Durchführbarkeit kann ihr Einsatz zur Identifizierung von Galtstreptokokken in der Routinediagnostik empfohlen werden.

4. Zusammenfassung

Es wurden 355 aus Milchproben gewonnene Streptokokkenisolate, darunter 183 Streptokokken der serologischen Gruppe B, mit einem im Handel erhältlichen Latex-Agglutinations-Test für B-Streptokokken und mit dem Standard-CAMP-Test untersucht. 68 der Isolate wurden mit zwei weiteren Latex-Agglutinations-tests geprüft. Ferner wurde bei allen Stämmen die Hippurat-Spaltung und das Pigmentbildungsvermögen beurteilt.

Von den 183 B-Streptokokkenisolaten reagierten im Strep B Latex-Agglutinations-Test 98,9% positiv. Fünf Isolate, die nicht der Gruppe B angehörten, führten zu einem positiven oder fraglichen Ergebnis. In den anderen beiden Agglutinations-Tests zeigten alle 47 untersuchten B-Streptokokken deutliche Agglutinationen. Im CAMP-Test zeigten fast 94% der B-Streptokokken ein positives Ergebnis. Hippurat spalteten 91,3% und Pigment in DMS-Medium bildeten 54,1% der Streptokokken der serologischen Gruppe B.

Die untersuchten Latex-Agglutinations-Tests werden wegen ihrer einfachen und schnellen Durchführung sowie der hohen Sicherheit und guten Ablesbarkeit der Ergebnisse für den Einsatz in der Routinediagnostik zur Identifizierung von B-Streptokokken empfohlen.

Summary

Diagnosis of *Streptococcus agalactiae* Mastitis by Latex Agglutination and the Camp-Test

355 streptococcal isolates from bovine sources including 183 streptococci of serological group B were tested.

Commercial latex agglutination tests and the standard Camp-test were used.

Additionally hippurate hydrolysis and pigment production was observed.

98.9% of 183 B-streptococci reacted with the Strep B testkit and 5 strains other than group B agglutinated as well or were indefinite. Two more latex agglutination tests correctly grouped all 47 B-streptococci out of 68 isolates. There was no indefinite result.

94% of the B-streptococci gave a positive reaction in the Camp-test.

Hippurate was hydrolysed by 91.3% of the B-streptococci and 54.1% showed pigment production in DMS-medium.

The testkits can be recommended for routine mastitis diagnosis. They can be performed easily and are highly reliable.

5. Literaturverzeichnis

ARVILOMMI, H.; O. UURASMAA und A. NURKKALA (1978)

Rapid identification of group A, B, C and G beta-haemolytic streptococci by a modification of the co-agglutination technique. Comparison of results obtained by co-agglutination, fluorescent antibody test, counterimmuno-electrophoresis, and precipitin technique.

Acta path. microbiol. scand. Sect. B 86, 107-111

AYERS, S. H. und P. RUPP (1922)

Differentiation of hemolytic streptococci from human and bovine sources by the hydrolysis of sodium hippurate

J. infect. diseases 30, 388-389

BARNUM, D. A. (1950)

The use of the CAMP-test for the rapid identification of streptococcus agalactiae

Rep. Ontario Vet. Coll., 120-125

BECHT, H. (1961)

Vorschlag zur Mastitis-Diagnostik

Schweiz. Arch. Tierheilk. 103, 627-630

BEERWERTH, W. (1963)

Die Eignung der bakteriologischen Untersuchung von Kannenmilchproben als Grundlage eines Eutergesundheitsdienstes

Arch. Lebensmittelhyg. 14, 123-124

BEERWERTH, W. und A. KÖSER (1965)

Streptokokken verschiedener serologischer Gruppen als Mastitiserreger und ihr Vorkommen außerhalb des Rindereuters
Milchwissenschaft 20, 590-593

r

BEERWERTH, W.; A. KÖSER und A. BRÜHN (1965)

Die kulturelle Nachweisbarkeit von pathogenen Streptokokken in der Milch und ihre Beziehung zum Auftreten vermehrten Zellgehalts

Milchwissenschaft 20, 519-524

BERNHEIMER, W. A.; R. LINDER und L. S. AVIGAD (1979)

Nature and mechanism of action of the CAMP-protein of group B streptococci

Inf. Imm. 23, 838-844

BIECHTELER, W. (1964)

Beitrag zur Routinediagnostik hämolysierender Streptokokken (OBF-Test nach Guthof, CAMP-Test, Antibiotogramm)

Zbl. Bakt., 1. Abt. Orig. 193, 48-59

BROWN, J.; R. FARNSWORTH; L. W. WANNAMAKER und D. W. JOHNSON (1974)

CAMP-factor of group B streptococci: production, assay and neutralization by sera from immunized rabbits and experimentally infected cows

Inf. Imm. 9, 377-383

CARLSON, J.R. und L.R. MC CARTHY (1979)

Modified coagglutination procedure for the serological grouping of streptococci

J.Clin.Microbiol. 9, 329-332

CHRISTIE, R.; N.E. ATKINS und E. MUNCH-PETERSEN (1944)

A note on a lytic phenomenon shown by group B Streptococci

Australian J. of Experimental Biology and Medical Science 22, 197-200

CHRISTENSEN, P.; G. KAHLMETER; S. JONSSON und G. KRONVALL (1973)

New method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies adsorbed to protein A-containing staphylococci

Inf.Imm. 7, 881-885

CUMMING, C.G.; P.W. ROSS; J.R. PAXTON und W.H. MC BRIDE (1980)

Grouping of beta-haemolytic streptococci by enzyme-linked immunosorbent assay

J.Med.Microbiol. 13, 459-461

DANIEL, R.C.W. und D.A. BARNUM (1986)

Preliminary observations on the use of latex agglutination test for the detection of mastitis due to Streptococcus agalactiae in cows

Can.J.Vet.Res. 50, 133-135

DAJANI, A.S. (1973)

Rapid identification of beta-hemolytic streptococci by counterimmunoelectrophoresis

J.Immunol. 110, 1702-1705

DARLING, C.L. (1975)

Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material

J.clin Microbiol. 1, 171-174

DIERNHOFER, K. (1932)

Äsculinbouillon als Hilfsmittel für die Differenzierung von Euter- und Milchstreptokokken bei Massenuntersuchungen
Milchwiss. Forschungen 13, 368-374

DURAND, P. und P.GIRAUD (1923)

Les Streptocoques chromogenes

C.R.Acad.Sci.Paris, 177, 1333-1335

EDBERG, S.C. und S.SAMUELS (1976)

Rapid, colorimetric test for the determination of hippurate hydrolysis by group B streptococcus

J.clin.Microbiol. 3, 49-50

EDERER, G.M.; M.M.HERRMANN; R.BRUCE; J.M.MATSEN und S.S.
CHAPMAN (1972)

Rapid extraction method with Pronase B for grouping beta-
hemolytic streptococci

Appl.Microbiol. 23, 285-288

EDWARDS, S.J. (1933)

A differential plating medium for *Streptococcus mastitis*

Proc. Roy. Soc. Med. 26, 8

EDWARDS, S.J. (1940)

The diagnosis of *Streptococcus agalactiae* in a liquid
selective medium

Soc. of Agriculture Bact. Abstr. of Proc. 1938

ref. Milchwissenschaftl. Forschung 20, 196-198

EDWARDS, E.A. und G.L.LARSON (1973)

Serological grouping of hemolytic streptococci by Counter-
immunoelectrophoresis

Appl.Microbiol. 26, 899-903

EDWARDS, E.A. und G.L.LARSON (1974)

New method of grouping beta-hemolytic streptococci directly
on sheep blood agar plates by coagglutination of specifically
sensitized protein A-containing staphylococci

Appl.Microbiol. 28, 972-976

EL KHOLY, A.; L.W.WANNAMAKER und R.M.KRAUSE (1974)

Simplified extraction procedure for serological grouping of
beta-hemolytic streptococci

Appl.Microbiol. 28, 836-839

FACKLAM, R.R.; J.F.PADULA; L.G.THACKER; E.C.WORTHAM und B.J.
SCONYERS (1974)

Presumptive identification of group A, B and D streptococci

Appl.Microbiol. 27, 107-113

FACKLAM, R.R.; R.C.COOKSEY und E.C.WORTHAM (1979)

Evaluation of commercial latex agglutination reagents for
grouping streptococci

J.Clin.Microbiol. 10, 641-646

FALLON, R.J. (1974)

The rapid recognition of Lancefield group B haemolytic
streptococci

J.clin.Path. 27, 902-905

FERRIERI, P.; L.W.WANNAMAKER und J.NELSON (1973)

Localization and characterization of the hippuricase activity
of group B streptococci

Inf.Imm. 7, 747-752

FEY, H. (1953)

Unsere Erfahrungen mit dem CAMP-Test zur Differenzierung von
Streptococcus agalactiae

Schweiz.Arch.Tierheilk. 95, 247-254

FINCH, R.G. und I. PHILLIPS (1977)

Serological grouping of streptococci by a slide
coagglutination method

J. Clin. Path. 30, 168-170

FODSTAD, F.H. und O. BRATLIE (1954)

Bidrag til mastitisdiagnostikken

Nord. Vet.-Med. 6, 366-374

FUCHS, P.C.; C. CHRISTY und R.N. JONES (1978)

Multiple-inocula (replicator) CAMP-test for presumptive
identification of group B streptococci

J. clin. Microbiol. 7, 232-233

FULLER, A.T. (1938)

The formamide method for extraction of polysaccharides from
haemolytic streptococci

Brit. J. exp. Path. 19, 130-139

GUINET, R.; J. ANDRE; G. BARBE; M. BOUDE; G. CARRET; A.M.

FREYDIERE; J. GILLE; J.P. MARCEL und M.A. MAZOYER (1982)

Serological grouping of streptococci: A collective evaluation
of six laboratories of three rapid methods

Med. Microbiol. Immunol. 171, 23-32

GUTHOF, O. (1961)

Ein einfacher Routinetest für die Gruppendifferenzierung von
Streptokokken (Optochin/ Bacitracin/ Furacin- Blättchentest)

HAHN,G.; W.HEESCHEN und A.TOLLE (1970)

Streptococcus- Eine Studie zur Struktur, Biochemie, Kultur
und Klassifizierung

Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsberichte 22, 333-546

HAHN,G. und I.NYBERG (1976)

Identification of streptococcal groups A,B,C and G by slide-
co-agglutination of antibody-sensitized protein A-containing
staphylococci

J.Clin.Microbiol. 4, 99-101

HAHN,G. (1980)

Identifizierung von Streptokokken verschiedener serologischer
Gruppen unter Verwendung der Latex-Agglutination

Lab.Med. 4, 102-106

HAHN,G. (1981)

Ergebnisse aus der Streptokokken-Zentrale in Kiel von 1965-
1978 - Mastitis-Streptokokken

Zbl.Bakt.Hyg.,1.Abt.Orig.A 249, 323-340

HAHN,G. (1982)

Vereinfachter Latex-Test zur Identifizierung der wichtigsten
Streptokokken-Species

Lab.Med. 6, 217-219

HANSEN, A. und O. WINTHER (1953)

Om anvendelsen af stafylokoktoksin ved undersøgelsen af blandingsmælk for mastitisstreptokokker. Foreløbig meddelelse.

Nord. Vet.-Med. 5, 349-358

HAUGE, S. und J. KÖHLER-ELLINGSEN (1953)

Et selektivt agar-medium (T.K.T.-mediet) beregnet til pavisning av gruppe B-streptokokker i samlemelk (leverandør-melkeprover).

Nord. Vet.-Med. 5, 539-547

HEDEN, E. und S. ILLENI (1975)

Immunelectroosmophoresis and electroimmunassay in clinical microbiology

Autom. in Microbiol. and Immunol.

Verlag John Wiley und Söhne, Ny. Land Cidny, Texas

HEESCHEN, W. und A. MEYER (1965)

Untersuchungen über biochemische Eigenschaften und serologische Gruppenzugehörigkeit von Mastitis-Streptokokken

Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr. 28, 269-271

HEESCHEN, W.; A. TOLLE und H. ZEIDLER (1967)

Zur Klassifizierung der Gattung Streptococcus

Zbl. Bakt., 1. Abt. Orig. 205, 250-259

HEESCHEN, W.; A. TOLLE und H. ZEIDLER (1968)

Die selektive Züchtung und Anreicherung Koagulase-positiver Staphylokokken und euterpathogener Streptokokken in flüssigen Nährmedien

Archiv für Lebensmittelhygiene 8/9, 184-189

HELLMANN, E.; J. HENTSCHE und B. STALDER (1971)

Untersuchung von Streptokokken aus Milch mastitiskranker und gesunder Rinder mit dem CAMP-Test und mit gruppenspezifischen Seren

Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr. 84, 121-124

HILL, H. R.; M. E. RITER; S. K. MENGE; D. R. JOHNSON und J. M. MATSEN (1975)

Rapid identification of group B streptococci by counterimmunoelectrophoresis

J. clin. Microbiol. 1, 188-191

HOFFMANN, R. (1972)

Untersuchungen über Vorkommen und Bedeutung von Streptokokken unterschiedlicher serologischer Gruppen in der Milch

Monatsh. Vet. Med. 27, 472-474

HOTIS, R. P. und W. T. MILLER (1936)

A simple method for detecting mastitis streptococci in milk

United States Dept. Agr. Circular 400, 1936

HOVMAND, H.C. (1952)

Sun-CAMP-test for the detection of *Streptococcus agalactiae*
in bulk milk

Nord. Vet.-Med. 4, 901-907

HRYNIEWICZ, W.; P.B. HECZKO; R. LÜTTICKEN und L.W. WANNAMAKER
(1976)

Comparison of three methods for grouping streptococci

J. clin. Microbiol. 4, 28-31

HWANG, M. und G.M. EDERER (1975)

Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive
identification of group B streptococci

J. clin. Microbiol. 1, 114-115

ISLAM, A.K.M.S. (1977)

Rapid recognition of group B streptococci

Lancet 1, 256-257

ITO, R. (1940)

Über die hochgradige Steigerung des Hämotoxinbildungsver-
mögens des *Streptococcus hämolyticus* durch Nucleinsäure

5. Mitteilung: Über die spezifische entgiftende Wirkung der
Farbstoffe der Trypanblaureihe auf das Streptolysin

Fol. jap. pharmacol. 30, 11-13

ref. Zbl. Bakt. 1. Abt. Referate 140, 98

JEWES, L.A. und D.JONES (1986)

Rapid method for the detection of group B streptococci from human sources

J.appl.Bact. 61, 219-223

JOKIPII, A.M.M. und L.JOKIPII (1976)

Presumptive identification and antibiotic susceptibility of group B streptococci

J.clin.Path. 29, 736-739

JÜRGENS D.; F.Y.Y.I. SHALABY und F.J.FEHRENBACH (1985)

Purification and characterization of CAMP-factor from Streptococcus agalactiae by hydrophobic interaction chromatography and chromatofocusing

J.chromatography 348, 363-370

KARASEK, E. (1970)

Zur fluoreszenzserologischen Identifizierung von Galtstreptokokken

Mo.hefte Vet.Med. 25, 319-320

KEXEL, G. (1965)

Biologische Routinediagnostik der hämolysierenden Streptokokken

Ärztl.Labor 11, 327-330

KIRKEGAARD, M.K. und C.R.FIELD (1977)

Rapid slide coagglutination test for identifying and typing group B streptococci

J.Clin.Microbiol. 6, 266-270

KLIMMER, M. und F. SCHÖNBERG (1947)

Milchkunde mit besonderer Berücksichtigung der Milchhygiene
und der hygienischen Milchüberwachung

5. Auflage, Verlagsbuchhandlung R. Schoetz

KÖHLER-ELLINGSEN, J. und S. HAUGE (1953)

Pavising av Streptococcus agalactiae i leverandormelk
(samlemelk) ved hjelp av T.K.T.-mediet (thalliumsulfat-
krystallviolett-toksin-mediet)

Nord. Vet.-Med. 5, 653-662

KRETZSCHMAR, C. (1959)

Über den kulturellen Nachweis von Galtstreptokokken aus
Einzel- und Sammelmilchproben unter Ausnutzung des CAMP-
Phänomens

Arch.exp.Vet.Med. 13, 678-684

KUHLMANN, W. und G. MÜLLER (1964)

Über die Kongorot-Betatoxin-Blutplatte nach BECHT

Arch.exp.Vet.Med. 18, 837-843

KUNTER, E. (1963)

Die Streptokokken-Präzipitation im Agar-Gel auf dem
Objektträger

Zbl.Bakt. 1.Abt.Orig. 188, 190-194

KUNTER,E. (1965)

Gewinnung des präzipitierenden gruppenspezifischen Streptokokkenpolysaccharids durch Erhitzen von Streptokokken im Autoklaven

Zbl.Bakt. 1.Abt.Orig. 197, 72-77

KUNTER,E. (1967)

Zum Nachweis von Galtstreptokokken in Milch

Mo.hefte Vet.Med. 22, 571-578

KUNTER,E. (1985)

Ein Schnelltest zum Nachweis der Hydrolyse von Natrium-Hippurat durch Streptokokken der serologischen Gruppe B

Mo.hefte Vet.Med. 40, 380-381

LÄMMLER,C.; F.H.PASARIBU und H.BLOBEL (1984)

Early recognition of the CAMP-reactivity in group B streptococci

Zbl.Bakt.Hyg. A 258, 183-186

LANCEFIELD,R.C. (1933)

A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci

J.Experim.Med. 57, 571-595

LANCEFIELD, R.C. (1934)

Loss of the properties of hemolysin and pigment formation without change in immunological specificity in a strain of *Streptococcus haemolyticus*

J.exp.Med. 59, 459-469

LELAND, D.S.; R.C.LACHAPELLE und T.M.WLODARSKI (1978)

Method for rapid detection of group B streptococci by coagglutination

J.Clin.Microbiol. 7, 323-326

LÖGERING, H.J. (1981)

Vergleichende Untersuchung fünf verschiedener Methoden zur Gruppenbestimmung von beta-hämolysierenden Streptokokken

Zbl.Bakt.Hyg. 1.Abt.Orig. A 248, 437-445

LOGAN, E.F.; D.J.MENEELY und D.P.MACKIE (1982)

Enzyme-linked immunosorbent assay for *Streptococcus agalactiae* antibodies in bovine milk

Vet.Record 110, 247-249

LUE, Y.A.; I.P.HOWIT und P.D.ELLNER (1978)

Rapid grouping of beta-hemolytic streptococci by latex agglutination

J.Clin.Microbiol. 8, 326-328

LÜTTICKEN, R. und D. FRITSCHKE (1974)

Bestimmung der B-Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*) mit Hilfe des "Dreifachtests" nach Wallerström und des CAMP-Tests
Zbl.Bakt.Hyg., 1.Abt.Orig. A 226, 298-304

LÜTTICKEN, R. (1981)

Rasche serologische Gruppierung von Streptokokken mit Hilfe der Latex-Agglutination
Ärztl.Lab. 27, 74-78

MANSI, W. (1958)

Slate-gel-precipitin-test
Nature 181, 1289

MARCHLEWICZ, B. A. und J. L. DUNCAN (1980)

Properties of a hemolysin produced by group B streptococci
Inf.Imm. 30, 805-813

MARKLEIN, G. (1979)

Erste Ergebnisse der Streptokokkendifferenzierung mittels Api-Strep-Teststreifen
Zbl.Bakt.Hyg., 1.Abt.Orig. A 243, 422-423

MAXTED, W. R. (1948)

Preparation of streptococcal extracts for Lancefield grouping
Lancet 155, 255-256

MERRITT, K. und N.J. JACOBS (1976)

Improved medium for detecting pigment production by group B streptococci

J.clin.Microbiol. 4, 379-380

MERRITT, K.; T.L. TREADWELL und N.J. JACOBS (1976)

Rapid recognition of group B streptococci by pigment production and counterimmunoelectrophoresis

J.clin.Microbiol. 3, 287-290

MEYER, B; E. HESS und H. BEISSNER (1978)

Eine verbesserte Methode zum Nachweis von Streptococcus agalactiae in Milch

Milchwissenschaft 33, 14-15

MEYER, C. (1978)

Beitrag zum serologischen Nachweis von Streptococcus agalactiae in Herdensammelmilch und sein Wert als Leitkeim neben der Zellzahl für den Eutergesundheitsdienst in Niedersachsen
Med.vet. Diss., TiHo Hannover

MEYN, A. und W. GEDEK (1962)

Zur Differenzierung von Streptococcus agalactiae mit Hilfe des CAMP-Tests

Berl.Münch. tierärztl. Wschr. 75, 281-282

MITSCHERLICH, E. (1965)

Der bakteriologische Nachweis von Streptococcus agalactiae in Milchproben

MOSIMANN,J und P.BRUNNER (1979)

Gruppierung beta-hämolysierender Streptokokken der Gruppen A, B,C und G mit dem Phadebact Streptococcus Test.

Zbl.Bakt.Hyg. 1.Abt.Orig. A 245, 25-32

MÜLLER,G. (1965)

Erfahrungen bei der Laboratoriumsdiagnose des Gelben Galtess

Mo.hefte Vet.Med. 20, 89-93

MÜLLER,G. (1967)

Der fluoreszenzserologische Nachweis von Streptokokken der Gruppe B 1.Mitteilung: Fluoreszenzserologische Technik

Mo.hefte Vet.Med. 22, 64-69

MUNCH-PETERSEN,E.; R.CHRISTIE und R.T.SIMMONS (1945)

Further notes on a lytic phenomenon shown by group B streptococci

Australian J. Exp. Biol. Med. Sci. 23, 193-195

MUNCH-PETERSEN,E.; R.CHRISTIE (1947)

On the effect of the interaction of staphylococcal betatoxin and group B streptococcal substance on red blood corpuscles and its use as a test for the identification of Streptococcus agalactiae

J.Path.Bact. 59, 367-371

MURPHY, J.M.; O.M.STUART und F.I.REED (1952)

An evaluation of the CAMP-Test for the identification of
Streptococcus agalactiae in routine mastitis testing

Cornell Vet. 42, 133-147

NOBLE, M.A.; J.M.BENT und A.B.WEST (1983)

Detection and identification of group B streptococci by use
of pigment production

J.Clin.Pathol. 36, 350-352

ORLA JENSEN, S. (1919)

The lactic acid bacteria, S.116

Host, Copenhagen

OTTO, R. (1960)

Experimentelle Untersuchungen über die Streptokokkengruppen-
präzipitation im Agargel

Zbl.Bakt. 1.Abt.Orig. 177, 546-554

OUCHTERLONY, O. (1949)

Antigen-antibody reactions in gels

Acta path.microbiol.scand. 26, 507-514

PHILLIPS, E.A.; J.W.TAPSALL und D.D.SMITH (1980)

Rapid tube CAMP test for identification of *Streptococcus*
agalactiae (Lancefield group B)

J.clin.Microbiol. 12, 135-137

POSTLE,D.S. (1968)

Evaluation of a selective medium for screening bulk milk samples for *Streptococcus agalactiae*

Am.J.Vet.Res. 29, 669-678

POUTREL,B. (1983)

Comparative evaluation of commercial latex agglutination and coagglutination reagents for groups B,C, and D mastitis streptococci

Am.J.Vet.Res. 44, 490-492

PULVERER,G. (1967)

Gruppendifferenzierung beta-hämolysierender Streptokokken mit Hilfe des OBF-testes nach Guthof und des CAMP-Testes

Zbl.Bakt.1.Abt.Orig. 204, 301-304

RANTZ,L.A. und E.RANDALL (1955)

Use of autoclaved extracts of hemolytic streptococci for serological grouping

Stanford Med.Bull. 13, 290-291

RATNER,H.B.; L.S.WEEKS und C.W.STRATTON (1986)

Evaluation of spot CAMP test for identification of group B streptococci

J.clin.Microbiol. 24, 296-297

REMMERS, J. (1975)

Bestimmung der B-Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*) mit Hilfe serologischer Methoden (Präzipitation, FA-Technik) und im CAMP-Test

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 104-106

RICHTER-MEERWALD, A. (1980)

Zur Differenzierung Äskulin-negativer euterpathogener Streptokokken mit Hilfe biochemischer und serologischer Methoden im Routinelabor

Med.-vet. Diss., München

ROMERO, R. und H.W. WILKINSON (1974)

Identification of group B streptococci by immunofluorescence staining

Appl. Microbiol. 28, 199-204

ROSNER, R. (1977)

Laboratory evaluation of a rapid four-hour serological grouping of groups A, B, C, and G beta-streptococci by the Phadebact *Streptococcus* Test

J. Clin. Microbiol. 6, 23-26

RÖTTGER, B. (1977)

Untersuchung zur direkten serologischen Bestimmung von B-Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*) in Milchproben

Arch. Lebensmittelhyg. 28, 15-17

SANDVIK, O. und S. HAUGE (1954)

En kritisk analyse av T.K.T.-mediet (thalliumsulfat-krystall-violett-toksin-mediet) med resulterende forbedringer
Nord. Vet.-Med. 6, 255-268

SAXEGAARD, F. (1977)

Comparative grouping of mastitis streptococci by means of co-agglutination and precipitation
Acta vet.scand. 18, 509-514

SCHALM, O.W. und W. LEIDL (1960)

Der Hotistest- eine einfache Methode zur Feststellung von Streptococcus agalactiae in der Milch.
Tierärztl. Umschau 15, 328-331

SCHIMMELPFENNIG, H. (1964)

Zur Anwendung der Fluoreszenzserologie in der bakteriologischen Diagnostik 2.Mitteilung: Nachweis und Differenzierung von Galtstreptokokken (Strept.agalactiae) mittels fluoreszierender Antikörper
Zbl.Vet.Med.. B 11, 407-417

SCHÜTZ, M.; H. LAUTH und H.U. WIESNER (1984)

Optimierung des serologischen Suchtestes mit der Counter-Immun-Elektrophorese sowie des kulturellen Nachweises von Streptococcus agalactiae in Milchproben
Arch.Lebensmittelhyg. 35, 58-60

SEELEMANN, M. (1954)

Biologie der Streptokokken

Hans Carl, Nürnberg, 2. Auflage

SEELEMANN, M. und G. OBIGER (1956)

CAMP-Test und TKT-Medium, ihre Bedeutung für Galt diagnose und
Galt bekämpfung

Milchwissenschaft 4, 98-103 und 134-140

SEELEMANN, M. und G. OBIGER (1958)

Über die Herstellung gruppenspezifischer Seren zur Strepto-
kokken-Differenzierung

Zschr. Hyg. 144, 503-534

SKALKA, B.; J. SMOLA und J. PILLICH (1980)

Comparison of some properties of the CAMP-factor from
Streptococcus agalactiae with the haemolytically latent
active exosubstance from Streptococcus uberis

Zbl. Vet. Med. B 27, 559-566

SKORKOVSKY, B. (1973)

RK-Test- Anwendung für die Diagnostik von Streptokokken der
Gruppe B

Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. A 224, 77-84

SKORKOVSKY, B. (1974)

KCNS (RK und RM)-, Bacitracin- und CAMP-Teste zur Differenti-
al-Diagnose von Streptokokken

Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. A 224, 205-212

SLIFKIN, M.; C.ENGWALL und G.R.POUCHET (1978)

Direct-plate serological grouping of beta-hemolytic streptococci from primary isolation plates with the Phadebact Streptococcus Test

J.Clin.Microbiol. 7, 356-360

SLIFKIN, M. und G.INTERVAL (1980)

Serogrouping single colonies of betahemolytic streptococci from primary throat culture plates with nitrous acid extraction and Phadebact streptococcal reagents

J.Clin.Microbiol. 12, 541-545

SMITH, A.R. und S.M.JOHNSTON (1972)

Rapid diagnosis for Streptococcus agalactiae and Streptococcus uberis

J. Milk Food Technology 35, 383-384

STABLEFORTH, A.W. (1950)

Die Mastitiden der Rinder mit besonderer Berücksichtigung des Streptococcus agalactiae

Dtsch.tierärztl.Wo.schr. 57, 253-258

STECHENBERG, B.W.; R.L.SCHREINER; S.M.GRASS und P.G.SHACKELFORD (1970)

Countercurrent Immunelectrophoresis in group B streptococcal disease

Pediatrics 64, 632-634

STÖPPLER, H. und M. HARR (1977)

Beitrag zur serologischen Absicherung der kulturellen
Galtdiagnose

Arch. Lebensmittelhygiene 28, 61-65

TANSKANEN, R. (1980)

Grouping of animal streptococci by latex agglutination and
staphylococcal co-agglutination tests

Acta vet. scand. 21, 702-704

TAPSALL, J. W. (1986)

Pigment production by Lancefield-group-B streptococci
(*Streptococcus agalactiae*)

J. Med. Microbiol. 21, 75-81

THAL, E. und G. OBIGER (1969)

Das CAMP-Phänomen des *Streptococcus agalactiae* und der neuen
serologischen Streptokokkengruppe "U" sowie weiterer
Bakterienarten

Berl. Münch. tierärztl. Wo. schr. 82, 126-130

TIESLER, E. und P. RECKTENWALD (1979)

Vergleichende Untersuchungen zur serologischen
Differenzierung von Streptokokken mit den Methoden der Prä-
zipitation, der Co-Agglutination und dem Fluoreszenztest

Imm. Inf. 7, 65-67

TOLLE, A. (1966)

Wissenschaftlicher Jahresbericht 1965, 2. Entwicklung leistungsfähiger kulturell-bakteriologischer Untersuchungsverfahren

Kieler Milchw. Forschungsberichte 18, 106-110

VOIGT, G. (1956)

Zur Frage der Streptokokkendifferenzierung mittels des CAMP-Testes und des TKT-Mediums

Vet.med. Diss.

WADSTRÖM, T.; C.E.NORD; A.A.LINDBERG und R.MÖLLBY (1974)

Rapid grouping of streptococci by immunoelectroosmophoresis
Med.Microbiol.Immunol. 159, 191-200

WAITKINS, S.A.; J.G.RATCLIFFE; R.D.ANDERSON und C.ROBERTS (1979)

Grouping of streptococci by Streptex
J.Clin.Path. 32, 1234-1236

WAITKINS, S.A. (1982)

A selective and differential medium for group B streptococci
Med.Lab.Sci. 39, 185-188

WALSER, K. und M.HASENKNOFF (1968)

Untersuchungen zur Routinediagnostik von Mastitis-Streptokokken und -Staphylokokken mit selektiven Anreicherungsmedien
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 81, 233-236

WARD, G.E.; D.S. POSTLE und D.T. BERMAN (1970)

Evaluation and proposed applications of a one-step method for isolation and identification of *Streptococcus agalactiae*
J. Am. Vet. Med. Ass. 156, 224-229

WATSON, B.K.; R.C. MOELLERING jr. und L.J. KUNZ (1975a)

Identification of streptococci: use of lysozyme and *Streptomyces albus* filtrate in the preparation of extracts for Lancefield grouping
J. Clin. Microbiol. 1, 274-278

WATSON, B.K.; L.J. KUNZ und R.C. MOELLERING jr. (1975b)

Identification of streptococci: serogrouping by immunofluorescence
J. Clin. Microbiol. 1, 268-273

WIESNER, H.U. (1979)

Serologischer Nachweis von B-Streptokokken in Herdensammel-
milch
Arch. Lebensmittelhyg. 30, 46-48

WILKINSON, H.W. (1977)

CAMP-disk-test for presumptive identification of group B streptococci
J. Clin. Microbiol. 6, 42-45

WITTNER, M.K. und J.A.HAYASHI (1965)

Studies of streptococcal cell walls

7. Carbohydrate composition of group B cell walls

J.Bact. 89, 398-402

LEBENS LAUF

Geburtsdatum: 21. August 1938

Geburtsort: Heidenheim a.d. Brenz

Eltern: Hedwig Banzhaf, geb. Thumm
Helmut Banzhaf

1963 - 1968: Grundschule in Heidenheim-Mergelstetten

1968 - 1977: Hellenstein-Gymnasium in Heidenheim

5. Mai 1977: Abitur

1979 - 1980: Schule für Medizinisch-technische Assistenten
in Tübingen

1980 - 1986: Studium der Tiermedizin an der Ludwig-
Maximilian- Universität München

9. Jan. 1986: Staatsexamen

Juli 1986: Approbation

Seit Jan. 1986: Dissertation

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Walser, der mir das Thema überlassen und mich bei der Durchführung der Arbeit durch Hilfestellung und Anregungen unterstützt hat.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. W. Gedek vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. in Grub und bei Herrn Dr. med. vet. E. Kleinschroth vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. in Kempten für die Überlassung der untersuchten Streptokokkenkulturen.

Ferner danke ich Herrn Dr. G. Hahn vom Institut für Hygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel für die Identifizierung der Streptokokkenstämme, die von uns nicht differenziert werden konnten.

